Vol. 14 1943

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

IMPERIAL MYCOLOGICAL
4 SEPT 1944
INSTITUTE

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Superintendente do Instituto Biologico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 119-A, São Paulo, Brasil.

Superintendente - Prof. Dr. H. da Rocha Lima.

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Superintendente do Instituto Biologico, P. O. Box 119-A - São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO CR $ 30,00

Vol. 14 1943

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Sauer, H. F. G.** — COMBATE À BROCA DO ALGODOEIRO "GASTEROCERCODES BRASILIENSIS HAMBL." (COL. CURC.) NOCIVA ÀS CULTURAS DO ALGODÃO ARBÓREO — Com 1 figura no texto e estampas 1-4.

   Control of the cotton borer "Gasterocercodes brasiliensis HAMBL." *(Col. Curc.) a pest of perennial cotton culture* 1-14

2. **Rocha e Silva, M.** — ESTUDOS SÔBRE PLANTAS TÓXICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM 27 PLANTAS CONSIDERADAS "SUSPEITAS" — Estampas 5-7.

   Studies on poisonous plants in the State of São Paulo. Toxicologic experiments on 27 plants which have been "suspected" of toxicity 15-30

3. **Bergamin, J.** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA BIOLOGIA DA BROCA DO CAFÉ "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERRARI, 1867)" (COL. IPIDAE) — Com 7 figuras no texto.

   Contribution to the knowledge of the coffee berry-borer "Hypothenemus hampei (FERRARI, *1867)" (Col. Ipidae)* 31-72

4. **Sauer, H. F. G.** — NOTAS SÔBRE A BIOLOGIA DE "ECPANTHERIA HAMBLETONI SCHAUS" (LEPID. ARCT.) — Com 1 figura no texto e estampa 8.

   Biological notes on "Ecpantheria hambletoni SCHAUS" *(Lepid. Arct.)* 73-80

5. **Reis, J. e R. C. Bueno** — VACINAÇÃO E MORTALIDADE NA CÓLERA AVIÁRIA.

   Increase in mortality following vaccination against fowl cholera 81-86

6. **Meyer, J. R.** — IMPORTANCIA DA ORIGEM DOS CAMONDONGOS USADOS PARA INOCULAÇÕES DE TUMORES TRANSPLANTAVEIS.

   On the importance of the origin of mice used in experiments carried out with transplantable tumors 87-90

7. **Meyer, J. R.** — A REAÇÃO LEUCOCITÁRIA PROVOCADA POR ENXERTOS DE ADENOCARCINOMA EM CAMONDONGOS DE LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETIVEL AO TUMOR — Estampas 9-10.

   The leucocytic reaction induced by grafting of an adenocarcinoma into a resistant and into a susceptible strain of mice . . 91-96

(CONTINUA)

Págs.

8. **Meyer, J. R.** — DIMINUIÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ENXERTOS DE ADENOCARCINOMA TRANSPLANTAVEL DE CAMONDONGO MEDIANTE LESÃO DO SISTEMA RETICULO ENDOTELIAL — Com 2 figuras no texto.
On the decrease of the resistence against transplantable tumors, following injuries of the reticulo-endothelial apparatus . . . 97-104

9. **Silberschmidt, K.** — ESTUDOS SÔBRE A TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS — Estampa 11-17.
Studies about the experimental transmission of the "infectious chlorosis" of Malvaceae 105-156

10. **Carneiro, V. e R. Cunha** — ESTUDOS SÔBRE A ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DOS EQUIDEOS NO BRASIL.
Studies on infectious equine encephalomyelitis in Brazil . . . 157-194

11. **Pereira, C. e W. F. de Almeida** — SÔBRE ALGUNS PRECONCEITOS MORFOLÓGICOS NO GÊNERO "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" E SUA SIGNIFICAÇÃO TAXONÔMICA.
On some morphological prejudices on the genus "Trichomonas DONNÉ, *1836" and their taxonomic significance* 195-206

12. **Pereira, C. e M. P. de Castro** — UM MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA PARA O ESTUDO DA MORFOLOGIA INTERNA DE INVERTEBRADOS MICROSCÓPICOS EM TOTO-MONTAGEM — Estampas 18-19.
A silver impregnation method for the toto-mount study of the internal morphology of microscopical invertebrates 207-212

13. **Cuocolo, R.** — "PEREIRAIA" N. G., PARA O "PHYSOCEPHALUS LASSANCEI TRAV., 1921" (NEMATODA: SPIRURIDAE), COM REDESCRIÇÃO DA ESPÉCIE-TIPO — Com 7 figuras no texto.
"Pereiraia" n. g., for "Physocephalus lassancei TRAV., *1921" (Nematoda: Spiruridae), with redescription of tipe-species* . . 213-216

14. **Mello, M. J. e R. Cuocolo** — TÉCNICA PARA O XENODIAGNÓSTICO DA HABRONEMOSE GÁSTRICA DOS EQUÍDEOS — Com 1 figura no texto e estampa 20.
Technic for the xenodiagnosis of the gastric equine habronemosis 217-226

15. **Mello, M. J. e R. Cuocolo** — ALGUNS ASPETOS DAS RELAÇÕES DO "HABRONEMA MUSCAE (CARTER, 1861)" COM A MOSCA DOMÉSTICA — Estampa 21.
Some aspects of the relations between "Habronema muscae (CARTER, *1861)" and the house-fly* 227-234

16. **D'Apice, M.** — OBSERVAÇÕES SÔBRE O ABÔRTO CONTAGIOSO DAS EGUAS EM S. PAULO.
Investigations on equine abortion in S. Paulo 235-242

(CONTINUA)

Pags.

17. **Bitancourt, A. A.** — DISTRIBUIÇÃO TEÓRICA DE LESÕES EM FOLHAS OU FRUTAS, CAUSADAS POR INSETOS E OUTROS ANIMAIS OU POR AGENTES INFECCIOSOS TRANSMITIDOS POR VETORES.
Theoretical distribution of lesions on leaves and fruits caused by insects and other animals or by agents transmitted by animal vectors 243-252

18. **Bier, O.** — ESTUDOS SÔBRE A PRODUÇÃO DE TOXINA DIFTÉRICA DE ALTO VALOR ANTIGÊNICO (40-60 Lf) EM CONDIÇÕES FACILMENTE REPRODUTIVEIS.
Studies on the production of diphteric toxin of relatively high potency (40-60 Lf) on a reproducible medium 253-261

19. **Monte, Oscar** — TINGITIDEOS AMERICANOS (HEMIPTERA) — Com 3 figuras no texto.
American Tingitidae (Hemiptera). 263-272

20. **Pereira, C. e W. F. de Almeida** — REVISÃO DAS ESPÉCIES DE "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" DA GALINHA E DO POMBO DOMÉSTICOS — Com 29 figuras no texto.
Revision of the species of the genus "Trichomonas DONNÉ, *1836" from the domestic fowl an pigeon* 273-292

21. **Rocha e Silva, M.** — ESTUDOS SÔBRE A DICOUMARINA-3,3'-METILENO*BIS*-(4-HIDROXICOUMARINA). I. HISTORICO E EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES — Com 5 figuras no texto.
Studies on dicoumarin-3,3'methylenebis-(4-hydroxycoumarin). I. Historical survey and preliminary experiment 293-309

22. **Lepage, H. S.** — A "ESCAMA VERMELHA" DOS CITRUS EM SÃO PAULO. AONIDIELLA AURANTII (MASKELL) (HOMOPTERA-COCCOIDEA) — Com 2 figuras no texto e estampas 22-30.
The "Red-Scale" on Citrus in the State of São Paulo. Aonidiella aurantii (MASKELL) *(Homoptera-Coccoidea)* 311-330

23. **Lepage, H. S. e O. Giannotti** — NOTAS COCCIDOLÓGICAS (HOMOPTERA-COCCOIDEA) — Com 41 figuras no texto.
Notes on some Coccoidea (Homoptera) 331-350

24. **Bergamin, J.** — MÉTODOS DE LABORATÓRIO PARA OBSERVAÇÃO E CRIAÇÃO DE "DIATRAEA SACCHARALIS (FABRICIUS, 1794", A BROCA DA CANA — Estampa 31.
Laboratory methods for observation and rearing of "Diatraea saccharalis (FABRICIUS, *1794)", the sugar cane borer* 351-354

Vol. 14 — Art. 1 Setembro de 1943

COMBATE À BROCA DO ALGODOEIRO "GASTEROCERCODES BRASILIENSIS HAMBL." (COL. CURC.), NOCIVA ÀS CULTURAS DO ALGODÃO ARBÓREO

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 1-4

INTRODUÇÃO

Em vista dos resultados preliminares e altamente promissores obtidos no Estado de S. Paulo nas safras precedentes às de 1939-41, a Superintendência do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura (Inst. Biológico), pretendendo intensificar os estudos iniciados sôbre o combate à broca do algodoeiro, determinou que as experiências fossem conduzidas também em outras regiões do país.

Nos Estados centrais e sulinos, a partir do Estado do Espírito Santo, exploram-se essencialmente as variedades herbáceas, cujas culturas, devido às condições mais ou menos iguais, são iniciadas em épocas semelhantes, comportando-se a praga de modo idêntico nas diversas zonas compreendidas nessa extensa região algodoeira. Os trabalhos realizados pela Seção de Entomologia Agrícola do Inst. Biológico, em S. Paulo, poderão por isso ter aplicação a todos os algodoais desse território.

No Nordeste, cujas zonas mais ou menos semelhantes estão compreendidas entre os Estados da Baía e Piauí, as condições geralmente existentes determinam que a cultura nessa zona se processe em estações do ano diferentes das dos Estados acima citados.

Além do algodão herbáceo, cultivado nas relativamente estreitas faixas litorâneas, as variedades arbóreas ocupam áreas comumente pequenas, mas em número elevado nas vastas regiões nordestinas assoladas pelas sêcas ou, melhor, pela má distribuição das chuvas (fig. 1).

A broca do algodoeiro existente nesses Estados, segundo é até agora admitido por diversos autores, constitue uma variedade da espécie do sul, ou seja uma variedade de *Gasterocercodes brasiliensis* HAMBL.

Foi escolhida essa região para as novas experiências, tendo-se preferido, após um levantamento preliminar, o Estado da Paraíba, tanto na zona do litoral como na do sertão, para o seu estabelecimento,

por ser um dos Estados centralizados na região nordestina que mais facilidades proporcionava às observações, além de ser o de maior produção algodoeira.

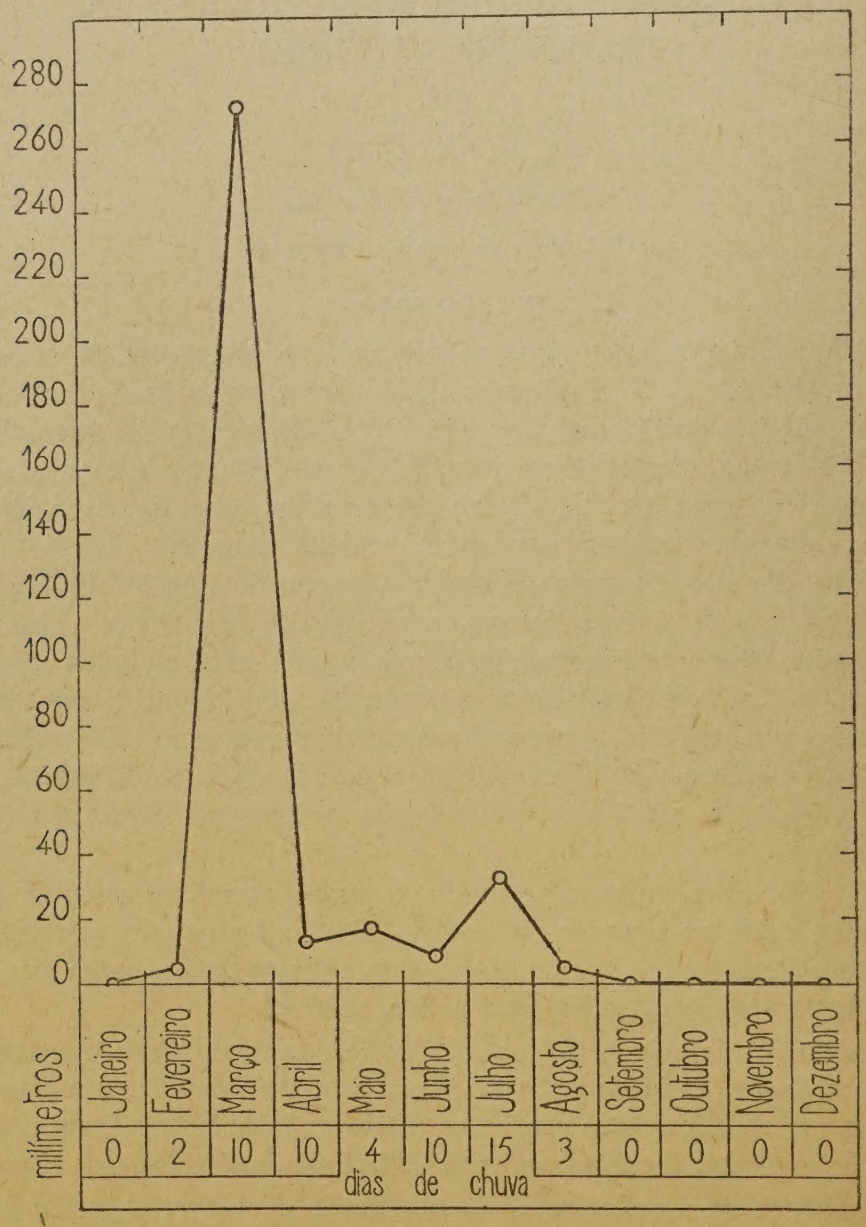


Fig. 1 — Gráfico da distribuição das chuvas durante 1941, em Soledade, Paraíba

Referimo-nos na presente publicação sòmente aos trabalhos realizados para o algodão "Mocó", cujas experiências se processaram preliminarmente em Alagoinha, na Fazenda Genipapo, e posteriormente no Campo Experimental de Soledade.

Aos Drs. Josué Pimentel, Diretor da Estação Experimental de Alagoinha, do Ministério da Agricultura; Carlos V. de Faria, Chefe do Serviço Experimental do Estado da Paraíba; Clarindo Gouvêa e Pedro Cordeiro, do Serviço de Fomento do Ministério da Agricultura, na Paraíba; e Pedro Rodrigues de Almeida, do Serviço de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, agradecemos as facilidades proporcionadas. Ao Snr. Nicodemes Martins, proprietário da Fazenda Genipapo, agradecemos igualmente os auxílios inúmeros recebidos na execução desses trabalhos.

ASPECTOS DA CULTURA DO ALGODÃO ARBÓREO NO NORDESTE E CONSIDERAÇÕES SÔBRE A IMPORTÂNCIA DA BROCA DO ALGODOEIRO

A cultura de algodão das variedades arbóreas representa para as extensas zonas do Nordeste brasileiro uma incontestavel fonte de renda de origem vegetal, sendo das poucas culturas que podem ser econòmicamente exploradas nas suas regiões semiáridas (Estampa 1, fig. *A*).

Datando de longos anos, a cultura do algodão arbóreo está amplamente difundida, mas a-pesar-dos esforços dispendidos pelas administrações públicas federais e estaduais, ainda é muito incipiente, sendo primitivos e de eficiência precária os processos culturais adotados. Não há variedades fixadas, e as mais definidas, como o Mocó e o Verdão, precisam ser melhoradas, sob os mais variados aspectos. Inegavelmente a atividade dos técnicos, estudando e procurando o melhoramento das variedades mais satisfatórias, assim como o das práticas culturais mais aconselhadas, muito vem contribuindo para que tal cultura seja mais remuneradora nessa região, cujas condições ecológicas são, para esse fim, insuperáveis. Entretanto, não estando ainda generalizado o aproveitamento prático dos resultados experimentais, nem assentado um sistema racional de cultura, os seus benéficos efeitos ainda não se fazem sentir de maneira apreciavel.

Com poucas exceções, as culturas algodoeiras do Nordeste não são praticadas de acôrdo com as fartas instruções fornecidas pelos técnicos e oriundas de bem fundadas experiências. O conservantismo impede a modificação de velhos por novos processos (Estampa 1, fig. *B*). Mesmo assim, tal cultura dá ao Nordeste cerca de 12 milhões de quilos de algodão de fibra longa, de qualidade excelente, e que enriquecem a semiaridez dos seus sertões. A importância dessa cultura, para tais condições, jamais deve ser menosprezada e todo esforço deve convergir para engrandecê-la.

A resistência às sêcas, bem como a longevidade, são sem duvida os pontos que lhe emprestam maior significação. A-pesar-da inclemência do tempo, não é raro ver-se algodoeiro de mais de duas décadas de existência, sendo frequentes os de quinze anos de idade. Doze anos, para muitas regiões, constituía período em que uma mesma cultura ainda era lucrativa.

De alguns anos para cá, porém, com o maior incremento da cultura, oito anos já constituem uma duração anormal para um algodoal. Quatro a seis anos é o período atualmente considerado econômico para explorar uma plantação, havendo conveniência em substituí-la ao fim desse prazo, porque daí por diante sua produção deixa de ser compensadora.

Diversos fatores vêm talvez determinando essa restrição de longevidade. Não resta a menor dúvida, porém, que a broca do algodoeiro é um dos mais consideraveis segundo nos foi dado verificar, o que coincide com a opinião generalizada dos técnicos.

Na zona litorânea, onde as variedades herbáceas são cultivadas, é que os prejuizos causados por essa praga são mais notaveis. E isso mesmo, sòmente quanto à mortandade ou prejuizo que diretamente origina, pois raramente são computadas as perdas oriundas do seu efeito indireto (prejuizos devidos à diminuição da produção, determinada pelo ataque da praga, a qual, sem causar a morte, ocasiona sérias perturbações no organismo vegetal). Nossas observações de mais de seis anos levam-nos a crer que em todas as zonas algodoeiras do país os prejuizos indiretos determinados pela broca são, si não maiores, pelo menos iguais aos ocasionados pela sua ação direta.

Nas zonas do sertão, conquanto as condições não pareçam favoraveis à praga, ela encontra na natureza perene das culturas o melhor elemento para resistir ao meio adverso, multiplicar-se e disseminar-se.

E' na primeira fase de seu desenvolvimento que a praga ocasiona os maiores danos aos algodoais dessa região, sendo comum uma cultura exigir mais de um plantio, porque até que o "enraizamento" do novo algodoeiro se processe, a broca determina perdas totais. E isso é explicado porque, não sofrendo contrôle os algodoais velhos, estes constituem focos permanentes de infestação. Por outro lado, a natureza lenhosa das velhas plantas, e condições inadequadas devidas ao ataque, tornam-nas menos propícias às infestações da broca do que as plantas jovens. Além disso, estas não teem suficiente porte para resistir ao ataque intenso e prejudicial. Desde, porém, que os algodoeiros estejam desenvolvidos, depois de "enraizados", os danos evidentes diminuem, dando lugar aos prejuizos menos perceptíveis, mas igualmente intensos. As plantas, já maiores, conseguem reagir, formando

nodosidades, ou hipertrofias, que se vão avolumando, obrigando a planta emitir novos brotos, que são igualmente atacados e seguidamente recompostos. Ou o ataque determina a morte dessas hastes, sinão de toda a planta; ou a sua natureza determina tal enfraquecimento que as torna facilmente sujeitas a serem quebradas pelos ventos, sempre constantes e de velocidade variavel; ou, si conseguem, a-pesar-de tudo, resistir, emitem ramos cuja frutificação se acelera, numa defesa da espécie. Os algodoeiros assim atacados têm o colo hipertrofiado, o caule caloso e sujeito à ação de fungos, que conforme as condições, podem causar o seu apodrecimento parcial ou total. (Est. 2, fig. *A*). A planta reage ao ataque da praga, formando novos tecidos, num esforço para manter a vida, o que redunda em enfraquecimento e redução da produtividade.

As regiões da planta primeiramente atingidas, após certo tempo já não oferecem as melhores condições para novas infestações. A broca então se dispersa. Os galhos são então procurados, normalmente na união com a haste principal. Muitos secam, ou quebram-se. Mas o ataque ainda progride, atingindo então as porções superiores dos ramos, que reagem hipertrofiando-se ou fendendo-se. As plantas sujeitas a tais ataques não resistem, nem produzem quanto as sadias. Enfraquecem-se, baixam a produção, e as condições climáticas não sendo favoraveis, morrem.

Os tratos culturais dados às lavouras não suprem as energias gastas com o "self protection" contra a praga. Antes constituem mais um elemento contra o qual as plantas têm de reagir. As podas, feitas muito rudimentarmente, quando não feitas por animais (bovinos ou carneiros), favorecem os efeitos nocivos da praga. Pouco é feito em beneficio da conservação da umidade no solo durante os períodos sêcos. Com raras exceções, nenhuma medida é executada visando limitar a ação da broca. Os ramos podados deixam-se nos lugares, e velhos algodoeiros não são eliminados. No entanto, a-pesar-de tudo, nessas condições, cujo quadro só perfuntoriamente foi descrito, a planta consegue manter-se por 4-6 anos. Não é de admirar que a longevidade das culturas venha decrescendo e que, com 4-6 anos, não haja planta que não mostre os evidentes resultados de um intenso ataque, por si mesmo suficiente para restringir a duração da vida, mesmo não existindo outros fatores determinantes de idênticos resultados.

Resumindo, eis como a broca do algodoeiro assume proporções de grande significação econômica nas culturas nordestinas: primeiramente, afetando e eliminando os jovens algodoeiros, causando danos diretamente visíveis; e em segundo lugar, provocando um enfraquecimento das plantas, reduzindo-lhe a capacidade de resistência e produtividade,

afetando a qualidade do produto, como causa indireta de prejuizos. Em face do exposto não é facil nem siquer aproximadamente traduzir monetariamente os prejuizos causados pela broca do algodoeiro, os quais raramente são avaliados em sua verdadeira extensão. Mas a exposição anterior será capaz de demonstrar o papel que ela desempenha si se considerar o seu efeito sobre as culturas, inteiramente sob sua influência, e cuja área média, de 1 a 5 Ha., constitue a regra nos muito difundidos algodoais daquela região.

MEIOS DE COMBATE

A-pesar-da broca do algodoeiro ocasionar prejuizos semelhantes tanto às variedades arbóreas quanto às herbáceas, os processos de profilaxia e combate atualmente preconizados são mais indicados para o algodão anual. Algumas medidas porém, podem ser aplicadas indiferentemente, outras necessitam ser adatadas às condições da cultura perene.

A adoção das medidas recomendadas a seguir, inclusive o tratamento por meio de pulverizações, visa reduzir a livre ação da praga; algumas delas, sendo práticas culturais aconselhadas, tem ainda o fim de tornar mais lucrativa a produção do algodão.

I — PROCESSOS CULTURAIS E PROFILÁTICOS

a) — Preparo conveniente do solo — E' óbvio que com o preparo adequado do solo antes do plantio beneficia-se a nova cultura, extremamente sujeita à ação devastadora da broca. Já porque proporciona melhores condições a vegetação, o que de certo modo faculta maior resistência da planta à praga, já porque perturba a permanência dos insetos no campo, essa prática não deve ser menosprezada.

b) — Semeadura abundante — Conquanto acarrete maior dispêndio de sementes e serviços, a prática de semear simultaneamente, além de maior quantidade de sementes do que a exigida nas covas do espaçamento regular, um maior número de covas intercaladas na cultura, é de evidente utilidade na formação do novo algodoal, quando a broca constitue um sério problema. Assim procedendo, o ataque se dispersará sobre maior número de plantas e consequentemente será menos intenso em cada uma delas. Distribuindo-se a postura por maior número de algodoeiros, a percentagem de indivíduos por pé será mais reduzida, facultando à planta maior capacidade de resistência. Nas covas definitivas as operações culturais, como desbaste, etc., seguem o ritmo usual. Nas intercaladas, quando a presença de ninfas for observada nas plantas, estas serão arrancadas com as

raizes e queimadas. Desse modo eliminar-se-á uma grande quantidade de indivíduos que se tornariam nocivos à futura cultura. Os adultos que motivaram esse ataque já estão depauperados e como se preveniu em parte a formação de novas gerações, a intensidade dos danos torna-se muito pequena. No Nordeste, devido às elevadas perdas determinadas pela broca, é comum fazer-se mais de um plantio numa mesma área. E como nem sempre as condições permanecem favoraveis, as culturas não se uniformizam num mesmo ano (Est. 2, Fig. *B*). Como é preciso aproveitar as escassas condições propícias, as despesas resultantes dessa prática são remuneradoras por redundarem também num melhor aproveitamento de tempo para a formação uniforme de uma cultura inicial.

c) — Duplo plantio — Em virtude da escassez ou irregularidade das chuvas, esse processo não será provavelmente exequivel com sucesso em todas as regiões do sertão. Nas zonas porém onde a pluviosidade for mais prolongada, o duplo plantio constitue uma prática de resultados palpáveis. Tal sistema constitue uma modificação do acima mencionado. Na área destinada à cultura depois de terem sido marcadas as covas definitivas, semeia-se o algodão sòmente nas ruas intercaladas. Sòmente depois que as plantas desse plantio tiverem cerca de 10 cms. de altura é que se executa, nas covas o plantio definitivo. As brocas serão atraídas para as plantas mais velhas e os algodoeiros oriundos do segundo plantio crescerão com muito menor infestação. Quando, nos algodoeiros do primeiro plantio, se observa a existência de ninfas da broca, êles devem ser arrancados e queimados. Os do segundo plantio devem sofrer o desbaste tardiamente.

Dessa maneira a primeira cultura age como isca, atraindo os adultos. Estes entram em atividade, mas pela eliminação e queima das plantas atalha-se ao aumento da população da broca. Desde que o aparecimento da nova geração seja prevenida, os primeiros adultos, envelhecidos e depauperados, pouco dano ocasionarão ao segundo plantio. Melhores e mais eficientes resultados obter-se-ão si os dois plantios forem tratados com pulverizações de arseniatos, como mostraremos adiante.

Pela redução da população das brocas favòrece-se o desenvolvimento inicial dos algodoeiros, facultando-lhes maior resistência, pois o vigor inicial é fator de suma importância na obtensão desse objetivo.

d) — Cultura no limpo e tratos culturais adequados — Não é necessário encarecer a conveniência de tais medidas. Refletindo benéficamente sobre a cultura, a adoção desses meios dificulta sobremodo as atividades da praga, devido às condições desfavoraveis que assim lhe são criadas.

e) — Queima das partes podadas e detritos da cultura — A broca do algodoeiro não restringe o ataque sòmente às partes do tronco ou caule próximas ao solo. Ataca indistintamente qualquer ramo ou galho, principalmente depois do tronco se tornar impróprio devido aos primeiros ataques. Após a colheita, a poda é processo usual, variando a técnica empregada. Os galhos podados, bem como os demais resíduos culturais, devem ser amontoados e queimados. Eliminam-se assim muitos estádios do inseto que, de outro modo, sobreviveriam e, concluindo o ciclo, prosseguiriam no ataque nas novas brotações.

f) — Arrancamento e queima dos algodoeiros abandonados — Não é esta uma medida frequente no Nordeste. Muitos algodoais, tornados improdutivos, são abandonados, constituindo assim focos perenes de criação da praga, o que determina o aumento da população de indivíduos que irão infestar outras culturas. Dado o dispêndio aparentemente inutil que ocasiona a prática de arrancamento e queima dos algodoais velhos é pouco compreendida e pouco aceita pelos lavradores. No entanto é das mais salutares, convindo ser rigorosamente observada, dados os benefícios que proporciona.

II — EMPRÊGO DE INSETICIDAS

Baseando-se nos resultados obtidos no combate à broca do algodoeiro, nas variedades herbáceas, por meio de inseticidas arsenicais, considerou-se possivel extender às arbóreas tratamento similar. Tais experiências foram encetadas primeiramente em Alagoinha (Paraíba), num algodoal realmente em zona inadequada e por isso mesmo abandonado, por não ser compensadora a sua exploração. Para a realização dos trabalhos, porém, por causa da sua elevada infestação, constituiu um campo excelente, uma vez que o intento era verificar a possibilidade do contrôle do inseto por esse processo. Depois de convenientemente preparada, essa cultura ofereceu ótimo campo às observações preliminares, que não tardaram em mostrar resultados satisfatórios (Est. 1, Fig. *B;* Est. 3, Fig. *A.*).

Posteriormente, porém em época equivalente, atendendo-se aos resultados obtidos, as experiências foram levadas para Soledade, zona propícia à cultura do Mocó, sendo realizadas num campo do Serviço de Experimentação Agrícola do Estado da Paraíba, inicialmente muito prejudicado pela praga, onde contamos com excelente e imprescindível ajuda do Chefe desse Serviço, Dr. CARLOS V. FARIA. Felizmente também aí os resultados foram satisfatórios, tendo sido objeto de uma nota preliminar, publicada na revista "Ouro Branco", Ano VII; N.º 11; Março, 142, pag. 8-10, editada em São Paulo, onde o autor, Dr. FARIA,

realça as suas vantagens, considerando o "processo vitorioso para o mocó", em face das quatro razões com as quais conclue o seu trabalho: não ser dispendioso; de execução facil; ação duradoura e inocuidade para a planta.

A broca do algodoeiro do Nordeste, considerada pelos autores como variedade de *Gasterocercodes brasiliensis* HAMBL. que ocorre nos Estados centrais e sulinos do país, tem hábitos idênticos aos desta. Os adultos alimentam-se das diferentes partes dos algodoeiros, preferindo, enquanto encontram condições propícias, as porções mais próximas ao solo. As fêmeas depositam os ovos nessas regiões, fazendo com o rostro perfurações para os abrigar. Dos ovos originam-se as larvas, que abrem galerias nos caules e, quando completamente desenvolvidas, constroem uma célula, na qual se transformará em ninfa, originando-se daí o adulto.

O hábito das formas imaturas torna pràticamente irrealizavel o seu combate, segundo os nossos conhecimentos atuais. Devido porém, aos seus, os adultos são mais facilmente combativeis, o que, em última análise, resulta mais eficaz, pois, com a eliminação deles, provoca-se uma redução da sua população numa cultura, de modo que não só a infestação geral se torna mais reduzida, como, em consequência, a porcentagem de indivíduos por planta é menor. O combate direto ao adulto tem assim duplo objeto: reduzir o número dos indivíduos que ocasionam a infestação e diminuir, como consequência, a intensidade do ataque à planta, o que faculta ao algodoeiro maior capacidade de reação. Si os adultos se alimentam ou fazem perfurações nos caules para efetuar a postura, estando essa parte envenenada provoca-se a sua morte ou reduz-se a capacidade ovipositora das fêmeas. Assim os princípios estabelecidos para a espécie do Sul, objeto de trabalho detalhado do autor, publicado nos "Arquivos do Instituto Biologico", v. 11: 499-530, c/ estampas, 1940, intitulado "Primeiros resultados das experiências do combate à broca do algodoeiro *G. brasiliensis*, por meio de pulverizações com caldas arsenicais", são verdadeiros também para as do Nordeste.

Em vista do inseticida ter ação direta sobre a praga, quer determinando a morte, quer diminuindo as suas atividades, dado que ela se pode alimentar de qualquer porção da planta, si todas as partes desta fossem tratadas, o contrôle seria teòricamente absoluto. Naturalmente isso não é possivel e seria mesmo antieconômico, mas mostra que quanto mais perfeitos os tratamentos, tanto melhores seriam os resultados. Num algodoeiro o tronco constitue a parte essencial; sendo ele sadío, a vitalidade e produtividade estarão mais garantidas. A proteção de ramos secundários não é tão importante, mesmo porque

si queimados, por ocasião da poda, os estádios imaturos do inseto neles contidos são eliminados.

A proteção da parte essencial constitue, portanto, ponto da maior importância, e as experiências visaram essa proteção.

COMBATE À BROCA COM INSETICIDAS ARSENICAIS

No tratamento dos algodoeiros três casos podem ser considerados. Êles não se referem pròpriamente ao ingrediente e modo de aplicação, porém ao estado da cultura e ao preparo a ser prèviamente executado.

1) — Nos algodoais novos o processo se reveste de extrema simplicidade. Todas as plantas devem ser completamente pulverizadas. As aplicações iniciar-se-ão cedo, quando as plantas atinjam cerca de 15-20 cms. de altura, e serão repetidas cada 20 dias. No caso de sobrevirem chuvas fortes, devem ser refeitas. Durante a estação sêca as pulverizações podem e, como medida econômica, devem ser mais espaçadas. Neste caso os intervalos serão de 50 dias. E' necessário que se mantenha a planta pulverizada, principalmente na região baixa do caule, e o lavrador poderá determinar, dentro dos intervalos recomendados, quando é que os tratamentos precisam ser executados. Quando as plantas estiverem mais desenvolvidas, as pulverizações restringir-se-ão à parte baixa do caule, cerca de 30-50 cms. acima do chão, ou pouco acima das primeiras ramificações (Est. 3, Fig. *B.*).

Mantendo a cultura limpa, principalmente na região ocupada pelos algodoeiros, os tratamentos tornam-se simples, e as aplicações, depois dêles desenvolvidos, poderão ser feitas pulverizando-se com os pulverizadores o caule ou caiando-o. A primeira modalidade é mais rápida mas requer maior quantidade de calda; a segunda é mais morosa. No entanto não há diferenças maiores quanto ao custo, sendo por meio das pulverizações mais perfeito o trabalho.

2) — Para tratar de um algodoal de plantas já desenvolvidas mas cujos caules se apresentam lisos e sem intenso fendilhamento da casca, o processo é semelhante ao citado, no qual se considera que a cultura vem sendo cuidada desde a formação. Há porém conveniência em ser afastada a terra ao redor do tronco, e a planta deve sofrer uma limpeza, eliminando-se os ramos sêcos ou o excesso de folhas. Depois de tratado, deve-se proceder à amontôa. Essa operação merece consideração devido ao hábito que tem a broca, de procurar penetrar na abertura do solo, que motivada pelo movimento da planta, circunda o caule para fazer bem no fundo a postura, alimentar-se ou abrigar-se. Retirando-se a terra, tratando-se o tronco e feita a amontôa, consegue-se

deixar o tronco envenenado sob o solo, de modo que a broca também aí possa ser atingida. O abandono dessa prática, mesmo que as demais operações tenham sido bem feitas, ocasiona sérios insucessos.

3) — Os algodoais velhos (Est. 3, fig. *C*) apresentam normalmente o tronco muito atacado e a casca muito fendilhada, o que impede que o líquido se distribua bem sôbre a sua superfície. Depois de feita a poda e cortados os ramos superfluos, a terra deve ser retirada do pé do algodoeiro. Procura-se a seguir, com escova de aço ou com a própria mão, limpar o tronco de toda a casca sêca, deixando-o bem limpo. (Est. 3, fig. *D*). A seguir faz-se a aplicação do inseticida, e chega-se novamente a terra. Nessas plantas convem que o tratamento atinja maior altura dos galhos e troncos, porque as condições geralmente impróprias da parte baixa fazem que a broca procure melhores condições nas partes mais altas de tais ramos. (Est. 4, fig. *A*).

EFEITO DO INSETICIDA SÔBRE A BROCA

Para verificar o efeito dos arseniatos sobre a broca, em algodoeiros arbóreos, tal como mostra a estampa 4, figs. *A* e *B*, as plantas foram tratadas pulverizando-se ou caiando-se os troncos com os inseticidas cujos resultados se mostraram mais satisfatórios nas experiências encetadas no Estado de São Paulo. Os adultos foram retidos em mangas de vidro sôbre as partes tratadas e, como testemunha, em número equivalente, sôbre porções não tratadas.

Diàriamente foram examinados e os resultados expressam-se na tabela 1.

TABELA 1

Tratamento de algodoeiros arbóreos "Mocó" mostrando a ação dos arseniatos sôbre a broca — Alagoinha, 1941

Inseticida usado	N.º de indivíduos mortos ao fim do							N.º de indivíduos
	1.º dia	2.º dia	3.º dia	4.º dia	5.º dia	6.º dia	7.º dia	
Ars. cálcio 0,5% . . .	12	18	23	27	30	—	—	30
Ars. chumbo 0,5% . .	—	1	16	20	22	26	30	30
Testemunha	—	—	—	—	—	—	1	30
Ars. cálcio 0,8% . . .	15	21	28	30	—	—	—	30
Ars. chumbo 0,8% . .	10	16	19	25	28	29	30	30
Testemunha	—	—	1	—	—	—	2	30
Ars. cálcio 1% . . .	15	26	29	30	—	—	—	30
Ars. chumbo 1% . . .	10	18	27	28	29	30	—	30
Testemunha	—	—	—	—	—	—	—	30

Os adultos dos lotes testemunhas mantiveram uma atividade normal, quer alimentando-se, quer realizando posturas durante o período observado. Os em contacto com as porções tratadas restringiram a alimentação, e a oviposição foi gradualmente decrescendo até o 3.º dia, cessando daí em diante.

PREPARO DO INSETICIDA

Em vista dos melhores resultados obtidos recomenda-se o uso do arseniato de cálcio.

Afim de que haja maior aderência e duração do inseticida sôbre as plantas, recomenda-se o emprêgo de um adesivo. O polvilho, óleo de peixe ou de linhaça, "fixalina", ou outros adesivos à base de caseinato de cálcio são de utilidade. Melhores resultados porém tivemos com o emprego do sabão de breu, que por sua vez parece ter ação repelente sôbre a broca.

Tal adesivo, não sendo usado na concentração devida, pode determinar a queima da folhagem, devendo por isso ser usada a metade da fórmula, quando as aplicações forem feitas sôbre algodoeiros novos. Quando as partes a tratar consistirem em troncos ou ramos, mesmo concentrações mais fortes não ocasionam danos.

Tomam-se um quilo de breu, bem triturado, quinhentas gramas de carbonato de sódio comercial e quatro litros de água. Numa vasilha de ferro ou latão, que possa ir ao fogo, colocam-se os ingredientes. Leva-se ao fogo e mexe-se continuamente. Ao levantar a fervura, agita-se fortemente, retirando-se do fogo em seguida, evitando que transborde; tudo estará dissolvido, e pronto o sabão de breu para ser adicionado lentamente, ainda quente, à calda prèviamente preparada, agitando-se fortemente.

700 grs. de arseniato de cálcio em 96 litros de água, mais o adesivo mencionado (usado na metade da concentração para os novos algodoeiros) e 700 grs. de cal, como neutralizador, constituem o inseticida aconselhavel para as pulverizações.

Devido ao baixo custo da mão de obra no sertão, assim como ao grande número de algodoeiros que podem ser pulverizados com essa quantidade, (2.846) esse tratamento não é oneroso (3,9 centavos por cova, inclusive as operações de limpeza) e os seus eficazes resultados tornam o processo econômico. Em vista do espaçamento observado no plantio do Mocó, é mister que se impeça a saída do inseticida no intervalo entre as plantas, afim de economizar a calda, pois, do contrário, haveria disperdício do líquido. Há, porém, dispositivos que facilitam o contrôle da saída do jato do pulverizador voluntariamente, e que não devem ser dispensados.

Os pulverizadores munidos de agitadores são os únicos indicados.

No caso de ser preferido o uso da caiação dos troncos dos algodoeiros, a fórmula aconselhada é a seguinte:

Arseniato de cálcio	700 grs.
Cal	2.000 grs.
Água	4 litros

Neste caso o custo orçou em 23 centavos por planta, inclusive todas as operações preliminares de limpeza. Este sistema é aparentemente mais dispendioso, mas o que encarece muito são as operações de limpeza, que, uma vez realizadas, só raramente precisam ser repetidas. A caiação em si não ultrapassou de 4,9 centavos por pé e por vez, ou sejam, nas duas caiações anuais, do inverno e verão, cerca de 10 centavos por algodoeiro, com material e mão de obra da região.

CONCLUSÕES

Dos experimentos feitos em Soledade os resultados podem ser assim resumidos:

1) O campo experimental do Serviço de Experimentação Agrícola da Paraíba apresentava-se em Junho de 1941 com uma elevada porcentagem de plantas atacadas (cerca de 35%), das quais, 2,4 % mortas, não se considerando as falhas da cultura (Estampa 2, fig. *B*) provocadas pelo ataque da praga.

2) Com os tratamentos iniciados em princípio de Junho, a redução do ataque foi prontamente verificada um mês depois e as plantas já atacadas começaram a reagir. Poucas plantas, ou 0,8% sòmente, tinham perecido em fins de Dezembro.

3) Tais resultados foram devidos à eliminação dos insetos adultos, prevenindo novas gerações da praga.

4) Os ramos e galhos superiores não sofreram ataque intenso, devido à diminuição da população dos adultos pela destruição sucessiva das gerações.

5) A opinião do Dr. Carlos de Faria, Chefe do mencionado Serviço que se apoia nos resultados obtidos, é de que o processo se recomenda por ser:

a) econômico; b) inofensivo à planta; c) de grande rendimento (um operário pode tratar de 2 a 3 hectares por dia; segundo o espaçamento); d) o inseticida, de ação duradoura sôbre a planta, já porque o período chuvoso é de pequena duração, já devido à ação fixadora do adesivo empregado.

CONTROL OF THE COTTON BORER "GASTEROCERCODES BRASILIENSIS HAMBL." (COL. CURC.) A PEST OF PERENNIAL COTTON CULTURE

Abstract

In this paper aspects of perennial cotton culture in the Northern States of Brazil during 1941 are discussed as well as the cotton borer economic importance. Considerations are also made about the methods of control either by arsenical sprays or prophilactic measures.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Fig. *A* — Vista típica da zona do Cariri, Soledade, Paraíba. Nos baixíos dessa região são cultivados algodoeiros arbóreos. (autor fot.).

Fig. *B* — Um algodoal nestas condições é, além de antieconômico, um foco permanente de criação e propagação da broca. (autor fot.).

Estampa 2

Fig. *A* — Tronco de algodoeiro Mocó, mostrando os efeitos do ataque pela broca. (autor fot.).

Fig. *B* — Aspecto do algodoal do Serviço de Experimentação, onde se notam as falhas motivadas pelo ataque da broca. Depois de tratado esse algodoal sofreu apenas 0,8% de perdas devidas à praga. (autor fot.).

Estampa 3

Fig. *A* — Trecho de algodoal visto em estampa 1, fig. *B*, depois de convenientemente limpo e tratado. (autor fot.).

Fig. *B* — Algodoeiro tratado, isento de praga. (autor fot.).

Fig. *C* — Algodoeiro muito velho, mostrando o fendilhamento da casca e a operação de limpeza que precede o tratamento. (P. R. Almeida fot.).

Fig. *D* — O algodoeiro da estampa 3, fig. *C*, depois de preparado, sofre a caiação. (P. R. Almeida fot.).

Estampa 4

Fig. *A* — Um dos algodoeiros usados para a determinação do efeito do inseticida sôbre a broca. Os adultos foram encerrados nas mangas de vidro colocadas na parte tratada e não tratada. (autor fot.).

Fig. *B* — Detalhe do algodoeiro da estampa 4, fig. *A*, vendo-se a manga na qual se encerraram as brocas para fins de observação.

Fig. *C* — Depois de podado e limpo, o algodoeiro é pulverizado. (P. R. Almeida fot.).

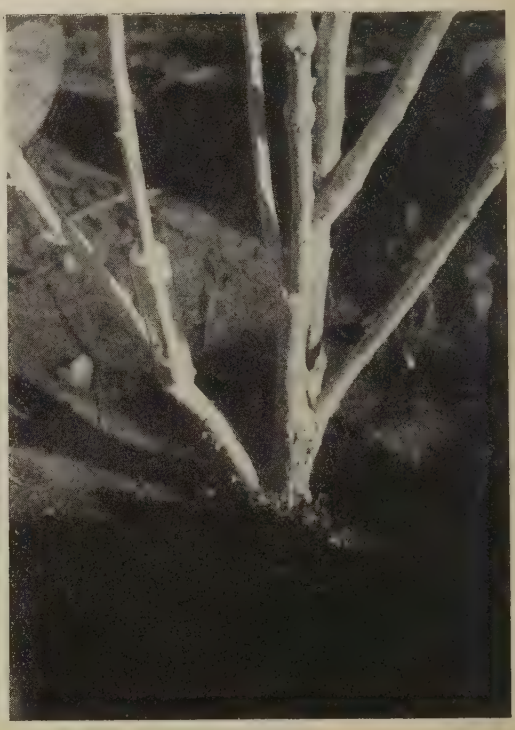
Fig. *D* — Três meses após o tratamento os algodoeiros apresentavam-se completamente transformados, vegetando normalmente e apresentando boa floração. (autor fot.).

———o———

A

B

A



B

C

D

Vol. 14 — Art. 2 Setembro de 1943

ESTUDOS SOBRE PLANTAS TÓXICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM 27 PLANTAS CONSIDERADAS "SUSPEITAS"

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 5-7

No estudo de 30 plantas toxicas do Estado de S. Paulo, constante de nossa primeira publicação (1), apenas em 4 verificamos algum valor toxicológico. Essas plantas tinham sido colhidas ao acaso em pastos recentemente formados da Fazenda Guanabara, em Andradina. As que estudaremos a seguir tiveram origem inteiramente diversa: foram-nos enviadas por fazendeiros e veterinários, como material s u s p e i t o de toxidêz. E' interessante notar que a porcentagem de plantas realmente tóxicas, neste novo lote, de 26 plantas, não é maior do que a encontrada naquele primeiro lote, de 30 plantas colhidas ao acaso. Póde-se portanto tirar a conclusão provisória, de que as plantas consideradas s u s p e i t a s não são mais nem menos tóxicas do que as colhidas ao acaso.

Esse resultado, aparentemente paradoxal, poderia ser esperado, dadas as dificuldades que se apresentam a um leigo para distinguir botanicamente plantas muito próximas. Muitas vezes, dentro mesmo de um gênero botânico, as diferentes espécies são dotadas das propriedades mais diversas, do ponto de vista toxicológico. Ao não botânico é quase sempre impossivel distinguir especies próximas de um mesmo gênero. Tivemos recentemente uma experiência curiosa com o numeroso grupo das chamadas hervas de rato (gênero *Palicourea)*. Dessas, como é sabido, a *Palicourea marcgravii*, herva de rato verdadeira, é muito tóxica. Interessados no estudo farmacológico dessa planta, pedimos aos nossos técnicos do Interior do Estado que nos enviassem pequena quantidade dela. Recebemos, desde então, quantidades apreciaveis dos mais variados materiais, rotulados como herva de rato. Algumas dessas plantas eram muito semelhantes á *Palicourea marcgravii*, algumas pertenciam ao mesmo grupo, mas com uma unica exceção, todas se mostraram completamente inócuas. Essa única que se mostrou tóxica *(Psychotria langsdorffiana* MUELL.), embora pertencendo ao grupo da verdadeira herva de rato, não era entretanto a espécie usualmente conhecida como tal *(Palicourea marcgravii)*. Fa-

tos como êsse restringem certamente o valor de certas informações que nos são mandadas do Interior, atribuindo à ação tóxica da herva de rato certas mortandades de animais de criação. A herva de rato verdadeira é tão dificil de distinguir das falsas, que só uma verificação precisa, botanica ou toxicológica, pode merecer crédito. A nós mesmos não tem sido raro enviar para a classificação botânica um material, que nos parecera homogêneo, e entretanto correspondia a 2 ou 3 espécies botânicas distintas. Parece-nos portanto importante chamar a atenção para as dificuldades inerentes ao problema e para a pouca significação de uma simples informação de que tal ou qual espécie botânica pode ser a origem de uma mortandade de animais, no campo.

Quero registrar aqui o meu reconhecimento pela gentileza com que sempre o Sr. J. F. de TOLEDO, do Departamento de Botânica do Estado, tem classificado o material botânico que usamos nos nossos estudos.

PARTE EXPERIMENTAL

Damos a seguir uma relação dos ensaios realizados em nosso laboratório para uma primeira verificação de toxidez das plantas que nos foram enviadas. Ensaios posteriores, para isolamento de princípios ativos e estudo farmacológico dos tóxicos extraídos de algumas dessas plantas, serão relatados futuramente.

Os ensaios aqui referidos foram feitos com extratos aquosos das plantas indicadas, os quais eram preparados por simples maceração do material em gráu e extração com água fisiológica, à temperatura ambiente. Como ensaio preliminar faziamos uma primeira injeção de 5 a 10 cc do extrato aquoso (equivalente a 2,5 a 10 gramas do material a estudar), no peritônio de cobaias pequenas (de 180 a 250 gramas). Esse ensaio só fornece resultados úteis quando o animal apresenta sintomas graves, ou morre, ao fim de alguns minutos ou poucas horas, a partir do momento da injeção. Uma morte tardia (ao fim de 24 horas, por exemplo) ocorre quase invariavelmente, em consequência de injeção intraperitoneal de extratos aquosos, seja de materiais tóxicos ou não. Uma morte rápida, entretanto, é uma primeira indicação de que a planta contem qualquer princípio tóxico. Esse primeiro ensaio é seguido de outro, em que 30 a 40 cc do extrato aquoso são administrados, por meio de sonda gástrica, a cobaias de 500 a 700 gramas de peso. O processo, muito frequentemente usado em outros laboratórios, de oferecer ao animal certa quantidade do material verde para injestão expontânea, pareceu-nos sempre muito incerto e absolutamente inadequado para um trabalho quantitativo sério.

Encontramos um paralelismo estreito entre a morte rápida pela injeção peritoneal e a morte pela injestão de grandes quantidades de extrato aquoso. Tem havido casos, entretanto, em que embora tóxico por via peritoneal, o material se mostra inócuo por via gástrica; o contrário, entretanto, nunca foi observado. Esses dois ensaios indicam pois dois gráos de toxidez, podendo-se excluir, de início, qualquer material que, por via peritoneal, não tenha matado ao fim de algumas horas.

Quando nos chegam ás mãos, as plantas estão quasi sempre sêcas e a quantidade de planta a ser extraida com 100 cc de agua, nunca é inferior a 20 ou 30 gramas. Quando o material é recente, um extrato de 50 a 100 gramas em 100 cc de agua é possivel. Se calcularmos que uma planta seca póde perder até 50 e 70% do seu peso, em agua, e que portanto um determinado peso de um material sêco corresponde pelo menos ao dobro do da planta fresca, isso significa que uma cobaia de 200 gramas, que recebe 10 cc deste extrato (a 20 ou 30%), no peritônio, está na realidade sendo injetada com uma quantidade de material correspondente a 5 ou 6 gramas da planta fresca. Essa quantidade corresponderia a 25 ou 30 gramas de material por quilo de cobaia, ou ainda á injeção de 2,5 a 3 quilos da planta por via intraperitoneal, em um bovino de 100 quilos! Pela via bucal, costumamos administrar 30 a 40 cc do extrato aquoso, o que, na base do calculo referido acima, corresponderia á injestão de 7,5 a 9 quilos de material fresco por um animal de 100 quilos, de uma única vez. Dessa maneira colocamos-nos em condições ótimas para verificar qualquer eventual toxidez das plantas que nos são enviadas. Quando, nesses ensaios, uma planta se mostra inócua, póde ser evidentemente abandonada, do ponto de vista toxicológico. Quando se mostra, entretanto, tóxica, é submetida a um estudo mais aprofundado, para caracterização ou isolamento do princípio tóxico, determinação da dose letal mínima, toxidez para os grandes animais da criação, etc..

RESULTADOS

Seguem-se os resultados obtidos aplicando-se ás 27 plantas que foram consideradas suspeitas o método experimental referido acima.

Leguminosae papillionatae.

Rhynchosia lobata DESV.

Procedência: Barra Bonita. Material em bôas condições. Estampa 5.
Extrato de 30 gramas de folhas da planta em 100 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 500 gramas, recebeu 22 cc. do extrato por sonda gástrica. Observada durante 3 dias. Nada de anormal. Cobaia n.º 2, de 500 gramas, recebeu 22 cc. por meio de sonda gástrica. Observada durante 3 dias. Nada de anormal.

Extrato de 50 gramas de sementes em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 3, de 350 gramas, recebeu 25 cc. do extrato por meio de sonda gástrica. Observada durante 3 dias. Nada de anormal.

Extrato de 40 gramas da planta (folhas) em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 4, de 650 gramas, recebeu 20 cc. do extrato por sonda gástrica; no dia seguinte, mais 40 cc. Nada de anormal apresentou nos dias subsequentes. Cobaia n.º 5, de 650 gramas, recebeu 15 cc. do extrato; no dia seguinte mais 32 cc., por sonda gástrica. Nada de anormal. Coelho n.º 1, de 1.200 gramas, recebeu 40 cc. por sonda gástrica. Nada de anormal.

Resultado: Negativo.

Compositae

Bacharis tenuifolia D. C.

Procedência: Jaú. Material em bôas condições, não florado. Designação popular: Miomio.

Extrato de 100 gramas da planta com 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 230 gramas, recebeu 15 cc. por via gástrica. Nada de anormal. No dia seguinte recebeu mais 20 cc. de novo extrato, por sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada de anormal. Cobaia n.º 2, de 195 gramas, recebeu 20 cc. do mesmo extrato. Nada de anormal. No dia seguinte recebeu mais 15 cc. de novo extrato. Nada de anormal nos dias subsequentes.

Extrato de 75 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 3, de 600 gramas, recebeu 25 cc. do extrato. Nada aconteceu.

Cobaia n.º 4, de 200 gramas, recebeu 15 cc. do extrato. Nada de anormal.

Nova remessa do mesmo material, completamente sêco. Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 5, de 300 gramas, recebeu 20 cc. do extrato por via gástrica. Nada de anormal. Cobaia n.º 6, de 310 gramas, recebeu 30 cc. do extrato por via gástrica. Nada de anormal.

Resultado: Negativo.

Sapindaceae

Serjania (sp. ?)

Procedência: Jaú. Material em bôas condições, não florado. Designação popular: Timbó de 9 fôlhas (?).

Extrato de 100 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 185 gramas, recebeu 15 cc. do extrato por meio de sonda gástrica. Observada durante 3 dias. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 2, de 340 gramas, recebeu 20 cc. do extrato. Nada de anormal. No dia seguinte recebeu mais 10 cc. do extrato. Observada durante 3 dias. Nada de anormal.

Resultado: Negativo.

Sapindaceae

Serjania cuspidata CAMB.

Procedência: São José dos Campos. Pequena quantidade de material em bom estado, não florado. Designação popular: Timbó de 3 quinas.

Extrato de 50 gramas da planta com 50 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 620 gramas, recebeu 18 gramas da planta por via gástrica. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Bignoniaceae

Pleonotoma variable MIERS.

Procedência: São José dos Campos. Pequena quantidade de material em bôas condições.

Extrato de 50 gramas da planta em 50 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 650 gramas, recebeu 20 cc. por via gástrica. Observada durante 4 dias. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Compositae

Porophyllum ruderale CASS.

Procedência: São José dos Campos. Pequena quantidade de material em bôas condições.

Extrato aquoso:

Cobaia n.º 1, de 670 gramas, recebeu quantidade de extrato correspondente a 35 gramas da planta, por meio de sonda gástrica. Observada durante 4 dias. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Sapindaceae

(Gen. sp. ?)

Procedência: São José dos Campos. Pequena quantidade de material. Designação popular: Cipó farinha.

Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 520 gramas, recebeu 20 cc. do extrato. Observada durante 4 dias. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Rubiaceae

Psychotria langsdorffiana MUELL.

Procedência: Barra Bonita. Material completamente sêco, não florado.

Extrato de 14 gramas da planta em 50 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 365 gramas, recebeu quantidade de extrato correspondente a 9 gramas da planta, por via bucal. Sintomas graves, pêlos arrepiados, paralisia

e morte ao fim de 5 horas. Autopsia: forte hiperemia gástrica, ligeiro enfisema pulmonar e hemorragias nos pulmões. Demais órgãos, com o aspecto habitual. Cobaia n.º 2, de 240 gramas, recebeu por via gástrica, quantidade da planta correspondente a 4 gramas de material. Mesmos sintomas da cobaia anterior; morte ao fim de 4 horas. Autopsia: ausência de hiperemia gástrica, enfisema e edema pulmonares. Pontos hemorrágicos nos pulmões. Demais órgãos, com o aspecto habitual. Cobaia n.º 3, recebeu subcutaneamente 8 cc. de um extrato a 100%. Morte em 6 horas. Autopsia: consideravel edema no local da injeção.

Resultado: Positivo.

Basidiomiceto

Polyporus sapurema MOELL.

Procedência: Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico. Forma perfeita do fungo, obtida pelo Dr. R. Drummond Gonçalves.

Extrato de 8 gramas em 18 cc. de água (total: 25 cc. do extrato):

Cobaia n.º 1, de 170 gramas, recebeu 10 cc. do extrato sob a pele. Sintomas graves, ao fim de 20 a 30 minutos da injeção. Inquietação e dificuldades respiratórias. Encontrada morta na manhã seguinte. Autopsia: na região injetada subcutaneamente, destruição completa da epiderme, com extensa quéda de pêlo. Forte hiperemia na parede muscular abdominal. Coelho n.º 1, de 2 quilos de pêso, recebeu, pela veia, 5 cc. de extrato. Morte fulminante em 2 minutos, aparentemente por choque circulatório. Coelho n.º 2, de 900 gramas, recebeu subcutaneamente 5 cc. do extrato. Depois da injeção, sintomas ligeiros, polipnéa, agitação; no dia seguinte, a epiderme, sob a área injetada, tinha sido destruida; forte reação inflamatória em torno da área injetada (estampa 6). Quatro dias depois o coelho foi encontrado morto.

Novo material recebido em Setembro de 1942:

Extrato aquoso de 10 gramas em 20 cc. de água:

Cobaia n.º 2, injetada com pequena quantidade, subcutaneamente. Forte hiperemia ao fim de alguns minutos, seguindo-se hemorragias e destruição do epitélio na área cutânea injetada. Morte de um dia para o outro.

Resultado: O fungo contém um princípio altamente inflamatógeno e hemorrágico. As lesões são muito semelhantes às produzidas pela injeção subcutânea de pequenas doses de aldeido fórmico.

Rubiaceae

Palicourea longipedunculata GORD.

Procedência: Terra Roxa (Fazenda Itaporan). Material em bôas condições, com folhas e flôres.

Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 710 gramas, recebeu por sonda gástrica, 30 cc. de extrato. Observada durante 3 dias. Nada aconteceu de anormal. Cobaia n.º 2, de 512 gramas, recebeu por sonda gástrica 30 cc. do extrato. Observada durante 3 dias. Nada de anormal. Cobaia n.º 3, de 200 gramas, recebeu no peritônio 10 cc. de extrato. Observada durante 6 horas. Nada apresentou de anormal. Amanheceu morta, no dia seguinte.

Resultado: Negativo.

Rubiaceae

Psychotria florestana

Procedência: Baurú. Material em bôas condições. Designação popular: Falsa herva de rato.

Extrato aquoso de 100 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 250 gramas, recebeu 10 cc. do extrato aquoso por via peritoneal. Morte em 2 horas. Coração em sistole, órgãos abdominais ligeiramente hiperemiados; pulmão normal. Cobaia n.º 2, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Encontrada morta 48 horas depois. Cobaia n.º 3, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 4, recebeu por meio de sonda gástrica, 30 cc. do extrato. Observada durante 3 dias. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 5, recebeu 35 cc. do extrato da planta, por meio de sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada apresentou de anormal. Test para saponinas: negativo.

Resultado: Negativo.

Euphorbiaceae

Euphorbia heterophylla L.

Procedência: Terrenos do Instituto Biológico. Material fresco, com flôres e frutos. Designação popular: Herva de leite.

Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, recebeu 5 cc. do extrato no peritônio e 5 cc. subcutaneamente. Encontrada morta no dia seguinte. Cobaia n.º 2, recebeu 4 cc. no peritônio e 4 cc. subcutaneamente. Encontrada morta 48 horas depois. Autopsia: formidavel edema hemorrágico no local da injeção. Cobaia n.º 3, recebeu 10 cc. no peritônio. Encontrada morta na manhã seguinte. Cobaia n.º 4, recebeu 12 cc. do extrato diretamente no estômago, por meio de sonda. No dia seguinte recebeu mais 14 cc. do mesmo extrato. Observada durante 2 dias. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 5, recebeu 10 cc. por meio de sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada apresentou de anormal. Coelho n.º 1, recebeu por via gástrica, 40 cc. do extrato. No dia seguinte recebeu mais 20 cc. de um extrato a 100% e no outro dia mais 20 cc. do mesmo extrato. Encontrado morto na manhã do 4.º dia do comêço da experiência. Autopsia: exsudato hemorrágico no peritônio, grande quantidade de líquido e um coagulo vermelho. Sinais de forte gastrite. Duodeno hiperemiado. Intestinos delgado e grosso com aspecto habitual.

Resultado: Embora pouco tóxica, por via gástrica, a planta contém um princípio edemaciante e hemorrágico, quando injetada subcutaneamente.

Rubiaceae

Psychotria capitata

Procedência: Baurú. Material em bom estado, completamente sêco. Designação popular: Falsa herva de rato.

Extrato aquoso de 20 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, recebeu 10 cc. do extrato por via intraperitoneal. Sintomas graves, ao fim de algumas horas. Encontrada morta no dia seguinte. Cobaia n.º

2, recebeu 5 cc. do extrato por via intraperitoneal. Sintomas imediatos ligeiros. Encontrada morta no dia seguinte. Cobaia n.º 3, de 500 gramas, recebeu 30 cc. por via gástrica. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 4, de 600 gramas, recebeu 20 cc. por via gástrica. Nada apresentou de anormal.

Novo extrato aquoso, de 30 gramas da planta em 150 cc. de água fisiológica:

Cobaias 3 e 4, receberam por sonda mais 30 e 20 cc. respectivamente do extrato, no dia seguinte. Observadas durante 2 dias. Nada apresentaram de anormal. Test para saponinas, com um extrato a 10%: negativo.

Resultado: Negativo.

Compositae

Baccharis articulata PERS.

Procedência: Fazenda dos Cristais, do Instituto Biológico. Material recente. Designação popular: Carqueja.

Extratos aquosos a 30%, do material sêco:

As cobaias que receberam 10 cc. desses extratos por via subcutânea ou peritoneal, morreram de um dia para o outro. Uma delas apresentou extenso edema subcutâneo com pontos hemorrágicos. Duas cobaias de 500 grms. e 700 grms., receberam respectivamente 30 e 35 cc. do mesmo extrato, por via bucal. Observadas durante 3 dias. Nada apresentaram digno de nota.

Resultado: Negativo.

Leguminosae papillionatae

Meibomia uncinata (D. C.) O. KUNT

Procedência: Maracaí (Fazenda Corredeira). Material completamente sêco, mas em perfeito estado.

Extrato de 20 gramas da planta em 100 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 190 gramas, recebeu 10 cc. do extrato no peritônio. Observada 24 horas. Nada aconteceu de anormal. Cobaia n.º 2, de 350 gramas, recebeu 35 cc. do extrato por meio de sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Compositae

Porophyllum ruderale CASS.

Procedência: São José dos Campos. Pequena quantidade de material em bôas condições.

Cobaia n.º 1, de 670 gramas, recebeu quantidade de um extrato aquoso, correspondente a 35 gramas da planta. Observada durante 4 dias, nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Rubiaceae

Psychotria leiocarpa

Procedência: Baurú. Material completamente sêco, mas em bom estado. Designação popular: Falsa herva de rato.

A planta foi pulverizada, fazendo-se em seguida um extrato aquoso de 20 gramas de pó em 80 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 170 gramas, recebeu 5 cc. no peritônio. Apresentou sintomas passageiros; recuperou completamente. Cobaia n.º 2, de 170 gramas, recebeu 10 cc. no peritônio. Morreu em 40 minutos.

Resultado incerto: a pequena quantidade de material recebido não permitiu a realização de experiências mais completas.

Leguminosae papillionatae

(Gen. sp. ?)

Procedência: Baurú. Gênero e espécie indeterminadas por falta de material mais completo.

Extrato de 60 gramas em 200 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 180 gramas, recebeu 5 cc. do extrato por via peritoneal. Observada durante 6 horas. Nada de anormal. Encontrada morta às 14 horas do dia seguinte. Cobaia n.º 2, de 170 gramas, recebeu 5 cc. do extrato por via peritoneal. Nada de anormal. Cobaia n.º 3, de 500 gramas, recebeu 30 cc. do extrato por via gástrica. Observada durante 2 dias. Nada de anormal. Cobaia n.º 4, de 700 gramas, recebeu 35 cc. do extrato, por via gástrica. Nada apresentou de anormal.

Resultado: Negativo.

Leguminosae papillionatae

Centrosema virginianum BENTH.

Procedência: ignorada. Classificação duvidosa, por falta de material completo.

Extrato aquoso, de 40 gramas da planta em 150 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 180 gramas, recebeu 5 cc. do extrato por via peritoneal. Nada apresentou de anormal. Cobaia n.º 2, de 200 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Encontrada morta no dia imediato. Hemorragias peritoneais e subcutâneas; edema no local da injeção. Cobaia n.º 3, de 600 gramas, recebeu 30 cc. do extrato diretamente no estômago, por meio de sonda. Nada aconteceu de anormal. Cobaia n.º 4, recebeu 35 cc. do extrato, por meio de sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada apresentou de anormal.

Resultado: Negativo.

Erythroxylaceae

Erythroxylon deciduum ST. HIL.

Procedência: Poços de Caldas. Pequena quantidade de material em excelentes condições.

Extrato a 25%, em água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 150 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Morte em 23 minutos. Sintomas de grande excitação, desequilíbrio, paralisia dos membros posteriores, regidez muscular. Autopsia: nenhuma alteração aparente nos órgãos da vida vegetativa. Cobaia n.º 2, de 150 gramas, recebeu 2,5 cc. do

extrato por via intraperitoneal. Sintomas graves depois de 20 minutos. Morte em 35 minutos. Sintomas semelhantes aos da cobaia n.º 1. Autopsia: nada de anormal nos órgãos abdominais ou no pulmão; coração ainda batendo fracamente. Cobaia n.º 3, de 150 gramas, recebeu 1 cc. do extrato por via intraperitoneal. Sintomas nervosos moderados, durante as 4 primeiras horas. Recuperou. Cobaia n.º 4, de 700 gramas, recebeu por meio de sonda gástrica, 35 cc. do extrato. Morte em 2 horas. Autopsia: enfisema pulmonar; demais órgãos normais.

Extrato de 20 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 5, de 150 gramas, recebeu 5 cc. do extrato, no peritônio. Dificuldades respiratórias, relaxamento do trem posterior, perda de equilíbrio. Comêço dos sintomas, 30 minutos depois da primeira injeção. Morte ao fim de 1 hora. Ausência de hemorragias e hiperemia no peritônio; demais órgãos com aspecto habitual.

Resultado: Positivo.

Bombacaceae

Bombax (sp. ?)

Procedência: Monte Aprazivel (Rancho Santa Leonor). Pequena quantidade de material incompleto.

Extrato aquoso de 20 gramas em 40 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 20 gramas, recebeu 10 cc. do extrato no peritônio. Nada aconteceu de anormal durante os 2 dias seguintes.

Resultado: Negativo.

Leguminosa mimosoidea

Mimosa myriophylla Bong.

Procedência: Monte Aprazivel. Classificação incerta, por falta de material completo.

Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 180 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Morte em 2 horas. Autopsia: ausência de hemorragias no peritônio; demais órgãos com o aspecto habitual. Cobaia n.º 2, de 200 gramas, recebeu 20 cc. no peritônio. Autopsia: não havia hemorragias no peritônio; demais órgãos com o aspecto habitual.

Resultado: Positivo.

Euphorbiaceae

Manihot (sp. ?)

Procedência: Pirajuí (Fazenda Bom Retiro). Material sêco e incompleto, enviado com a designação popular de "Mandioca do Mato"

Extrato de 100 gramas da planta com 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 140 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Encontrada morta no dia seguinte. Cobaia n.º 2, de 140 gramas, recebeu 5 cc. do extrato por via peritoneal. Nada aconteceu de anormal. Cobaia n.º 3, de 500 gramas, recebeu 50 cc. do extrato, por meio de sonda gástrica. Observada durante 2 dias. Nada aconteceu de anormal.

Test para HCN, com solução de ácido pícrico em carbonato de sodio, nitidamente positivo, de um dia para o outro.

Resultado: Negativo.

Leguminosae papillionatae

Rhynchosia phaseoloides (Sw.) D. C.

Procedência: Pitangueiras (Moura Andrade & Cia.). Material em excelente estado.

Extrato de 50 gramas da planta em 250 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 170 gramas, recebeu 10 cc. do extrato. Encontrada morta no dia seguinte. Cobaia n.º 2, de 700 gramas, recebeu 45 cc. do extrato, por meio de sonda, diretamente no estômago. Nada aconteceu. No dia seguinte recebeu mais 50 cc. do mesmo extrato, por via bucal. Nada aconteceu de anormal.

Resultado: Negativo.

Solanaceae

Cestrum sendtnerianum Mart.

Procedência: Pitangueiras (Moura Andrade & Cia.). Material em excelentes condições, florado e frutificado. Designação popular: Coerana (estampa 7).

Extrato de 50 gramas da planta em 100 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 180 gramas, recebeu 10 cc. do extrato, por via peritoneal. Morte em 1 hora. Autopsia: forte hiperemia de todos os órgãos abdominais. Cobaia n.º 2, de 500 gramas, recebeu 35 cc. do mesmo extrato por meio de sonda gástrica. Morte de um dia para o outro. Autopsia: forte hiperemia, com hemorragias dos órgãos abdominais, estômago e intestinos. Pontos hemorrágicos nas paredes do abdomem e na musculatura do tronco. Cobaia n.º 3, de 700 gramas, recebeu 30 cc. do extrato por via bucal. Morte em 5 horas. Autopsia: forte hiperemia dos órgãos abdominais.

Recebido novo material, em condições ótimas. Extrato de 100 gramas da planta em 200 cc. de água fisiológica:

Cobaia n.º 4, de 150 gramas, recebeu 5 cc. do extrato no peritônio. Morte em 30 minutos. Cobaia n.º 5, de 500 gramas, recebeu 25 cc. por sonda gástrica. Encontrada morta no dia seguinte. Autopsia: hiperemia moderada dos órgãos abdominais.

Feita uma experiência em carneiro:

Carneiro n.º 1, de 45 quilos, recebeu no primeiro dia (12 h, 10) um extrato aquoso correspondente a 400 gramas do material. Apresenta sintomas leves, apatia, perda de apetite. No dia seguinte, as fézes têm aspecto diarreico. Recebe mais 500 gramas da planta (12 h). Sintomas agravados; perda de apetite, apatia. Às 16 horas recebe mais 370 gramas da planta sob a forma de extrato aquoso. Diarréa profusa e grande abatimento. No dia seguinte amanheceu com aspecto e apetite normais. Observado durante uma semana. Recuperou completamente.

A planta se mostrou sempre tóxica para cobaias e produziu sintomas acentuados no carneiro n.º 1. Por falta de maior quantidade da planta não pudemos continuar as experiências em carneiro.

Suspeitada a presença de saponina, foi feito o test hemolítico com um extrato a 50% da planta. Obtivemos hemólise instantânea, de uma suspensão

de glóbulos lavados de carneiro (a 5%), até a diluição de 1/250 do extrato; hemólise parcial até 1/1000, em água fisiológica. A toxidez se mostrou absolutamente paralela com o poder hemolítico dos extratos. A técnica de extração dessa saponina tóxica e as experiências realizadas com uma fração satisfatoriamente purificada, serão descritas em trabalho separado.

Resultado: Positivo.

Malpighiaceae

Mascagnia pubiflora (A. JUSS.) GRISEB.

Procedência: Mato Grosso. Material sêco, em bôas condições.

Extrato de 50 gramas de folhas em 250 cc. de água:

Cobaia n.º 1, de 150 gramas, recebeu 10 cc. do extrato diretamente no peritônio. Morte ao fim de 1 hora. Ausência de hiperemia nos órgãos abdominais. Cobaia n.º 2, de 500 gramas, recebeu 50 cc. do extrato por meio de sonda gástrica. Sintomas acentuados; recuperou completamente. Cobaia n.º 2, de 500 gramas, recebeu 50 cc. do extrato por meio de sonda, diretamente no estômago. Sintomas ligeiros. Recuperou completamente. No dia seguinte recebeu mais 50 cc. por meio de sonda, no estômago. Recuperou completamente. Cobaia n.º 3, de 150 gramas, recebeu 10 cc. do extrato, no peritônio. Morreu ao fim de 1 hora e meia. Sintomas de paralisia muscular e contraturas. Autópsia: ausência de hiperemia nos órgãos abdominais e peritônio.

Nota: — Essa mesma planta foi por nós experimentada há 2 anos (1,2) e se mostrou tóxica por via gástrica. Como o material agora testado nos foi enviado de Mato Grosso e levou 6 a 7 dias a chegar ao Instituto, é possível que tenha perdido parcialmente a sua toxidez. Isso indica a necessidade de repetições dos testes, tantas vezes quantas se oferecer a oportunidade.

Resultado: Negativo (?).

Euphorbiaceae

Ricinus communis L.

Procedência: terrenos do Instituto Biológico. Material fresco; folhas. Designação popular: Mamona.

Feito extrato a 50% das folhas, em água fisiológica:

Cobaia n.º 1, de 180 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Morte em cerca de 1 hora. Cobaia n.º 2, de 200 gramas, recebeu 10 cc. do extrato por via peritoneal. Morte em 40 minutos Cobaia n.º 3, de 700 gramas, recebeu por meio de sonda gástrica, 35 cc. do mesmo extrato. Nada apresentou de anormal. No dia seguinte recebe mais 35 cc. do mesmo extrato. Observada durante 2 dias. Não morreu.

Resultado: Negativo (?).

DISCUSSÃO

Este trabalho representa o resultado de ensaios realizados no nosso laboratório, com 27 plantas que nos foram enviadas com a indicação de suspeitas de toxidez. Temos repetidamente salientado (1, 2, 3) que essa suspeita de toxidez na maioria dos casos não

resiste a um contrôle experimental sério. Foi típico, por exemplo, o caso de plantas do gênero *Rhynchosia,* que nos têm sido enviadas mais frequentemente do que quaisquer outras e que vêm referidas como "provavelmente" tóxicas em diversas publicações sobre o assunto. Submetemos duas espécies, *Rhynchosia minima* e *Rhynchosia lobata* a ensaios numerosos, que resultaram completamente negativos.

Os ensaios obedeceram a um critério sempre uniforme e que póde ser estabelecido como um critério prático de toxidez de qualquer material sobre o qual recáia a suspeita de produzir mortandade nos grandes animais de criação. O objetivo dos ensaios era, sobretudo, estabelecer por métodos simples e rápidos um conceito de toxidez que fosse útil para orientar os técnicos do Instituto no combate a doenças de animais de criação. Para isso, tres gráos de toxidez foram definidos. O primeiro, o mais baixo, por assim dizer, corresponde ao das plantas que são tóxicas quando injetadas no peritônio, na dose de 5 a 6 gramas por quilo de peso de cobaia. Numerosas plantas que são tóxicas nessas condições, mostram-se inócuas por via bucal, na dose de 15 a 20 gramas por quilo de peso. A administração de extratos aquosos por via bucal, nas doses de 30 a 35 cc para uma cobaia de 600 a 700 gramas, leva á verificação do que poderiamos chamar de "segundo gráo de toxidez". O interesse prático de se definirem esses diferentes niveis de toxidez deriva dos resultados colhidos em numerosas experiências. Muitas vezes um material que se mostrou tóxico por via peritoneal é completamente inócuo por via gástrica, ao passo que o contrário nunca foi por nós observado.

Para o fim que tinhamos em vista, de estabelecer a toxidez das diferentes plantas para os grandes animais de criação, o "primeiro gráo de toxidez" corresponderia ao de uma planta que fosse tóxica por injeção peritoneal, na dose de 2 a 3 quilos, para um bovino de 100 quilos de peso. Evidentemente, uma planta que se mostra inócua nessas condições não poderá constituir um perigo sério para os animais no campo. De um ponto de vista análogo, o segundo nivel de toxidez corresponde à injestão, por um bovino de 100 quilos, de cerca de 5 a 10 quilos da planta, dose evidentemente brutal. Uma planta que se mostrou tóxica ao segundo test, já póde, entretanto, ser considerada de interesse para um estudo toxicológico mais apurado, para determinação da dose letal mínima e possivel extração dos princípios tóxicos. De extrema importância é ainda submetê-la a ensaios que definam o que se poderia chamar de "terceiro gráo de toxidez". Essa terceira série de ensaios consiste em verificar em que dose poderá a planta matar um animal de grande porte, como um garrote de 100 quilos ou um carneiro de 40 a 50 quilos. Está claro que se fôr neces-

sária a administração, de uma só vez, de 1 a 2 quilos da planta, para matar um carneiro de 50 quilos, o interesse pratico da planta não será muito grande, porque as condições de injestão do material, no campo, só excepcionalmente se tornarão perigosas para a vida do animal. Ao contrário, uma planta que mate um bovino de 100 quilos na dose de 600 gramas ou 1 quilo, passa a ser um material altamente suspeito, sobretudo se profusamente distribuida nos campos em que vivem os animais. Para sermos rigorosos, devemos considerar suspeita, ou mesmo tóxica, qualquer planta que atravesse os dois primeiros niveis de toxidez, e aconselhar a extirpação do pasto, mesmo quando sejam precisos 2 a 3 quilos para matar um bovino. Isso, porque a toxidez póde ser cumulativa e porque, em condições excepcionais, a planta poderá constituir uma parte importante ou mesmo exclusiva da alimentação do animal.

De acordo com os resultados dos ensaios por nós realizados e que vêm referidos acima ou em publicações anteriores (ver Bibliografia), aconselhariamos a extirpação dos campos, das seguintes plantas: *Holocalyx glaziovii, Solanum viarum, Sida cordifolia, Asclepias curassavica, Psychotria langsdorffiana, Erythroxylon deciduum, Cestrum sendtnerianum* e *Mascagnia pubiflora*. As plantas que vêm assinaladas (espacejado) são certamente as mais tóxicas, e a permanência delas nos campos de criação poderá ser considerada de grande inconveniência.

STUDIES ON POISONOUS PLANTS IN THE STATE OF SÃO PAULO. TOXICOLOGIC EXPERIMENTS ON 27 PLANTS WHICH HAVE BEEN "SUSPECTED" OF TOXICITY

Abstract

This paper deals with the results of assays performed on 27 plants suspected of being toxic for stock animals. All of them, but 4, have been shown to be entirely non-toxic for guinea pigs under the conditions of our experiments.

Psychotria langsdorffiana, Erythroxylon deciduum, Cestrum sendtnerianum can be considered as fairly dangerous for stock feeding, while Mascagnia pubiflora, was much less toxic through gastric administration, in guinea pigs. From Cestrum sendtnerianum there was isolated in partially purified condition, a saponin-like substance displaying powerful hemolytic and toxic properties. All attempts to separate

chemically those two properties resulted unsuccessful. Therefrom, one might draw the conclusion that the toxic and hemolytic substance of Cestrum sendtnerianum is a "sapotoxin".

BIBLIOGRAFIA

1 — Rocha e Silva, M. — 1940 — O problema das plantas tóxicas no Estado de São Paulo. *O Biológico*, S. Paulo, 6, 59-66.

2 — Rocha e Silva, M. — 1940 — O problema das plantas tóxicas no Estado de São Paulo. II. A análise dos sintomas. *O Biológico*, São Paulo, 6, 254-258.

3 — Rocha e Silva, M. — 1940 — Fotosensibilização em bovinos. *Arq. do Inst. Biol.*, S. Paulo, 11, 461-488.

4 — Rocha e Silva, M. e O. Santiago — 1939 — Ensaios sôbre a toxidez e propriedades farmacológicas da planta "Asclepias curassavica". *Rev. da Soc. Paul. Med. Vet.*, 5, 129-143.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 5

Detalhes da planta *Rhynchosia lobata* DESV., frequentemente incriminada como causadora de mortandade dos animais da criação. Nos nossos ensaios mostrou-se completamente inócua.

Estampa 6

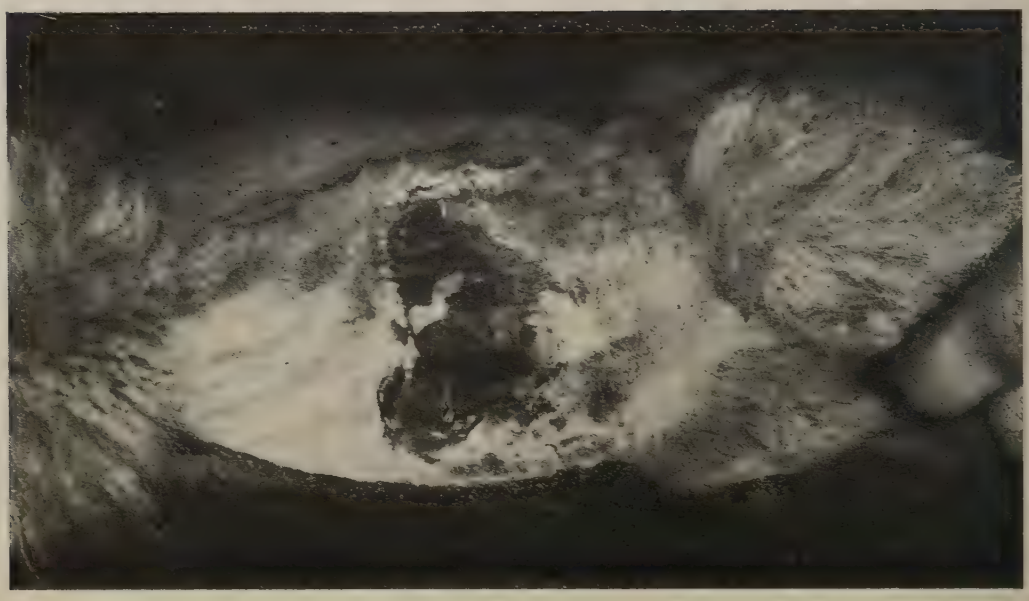
Lesões produzidas na pele de um coelho pela injeção sub-cutanea de um extrato aquoso da forma perfeita do fungo *Polyporus sapurema* MOELL.

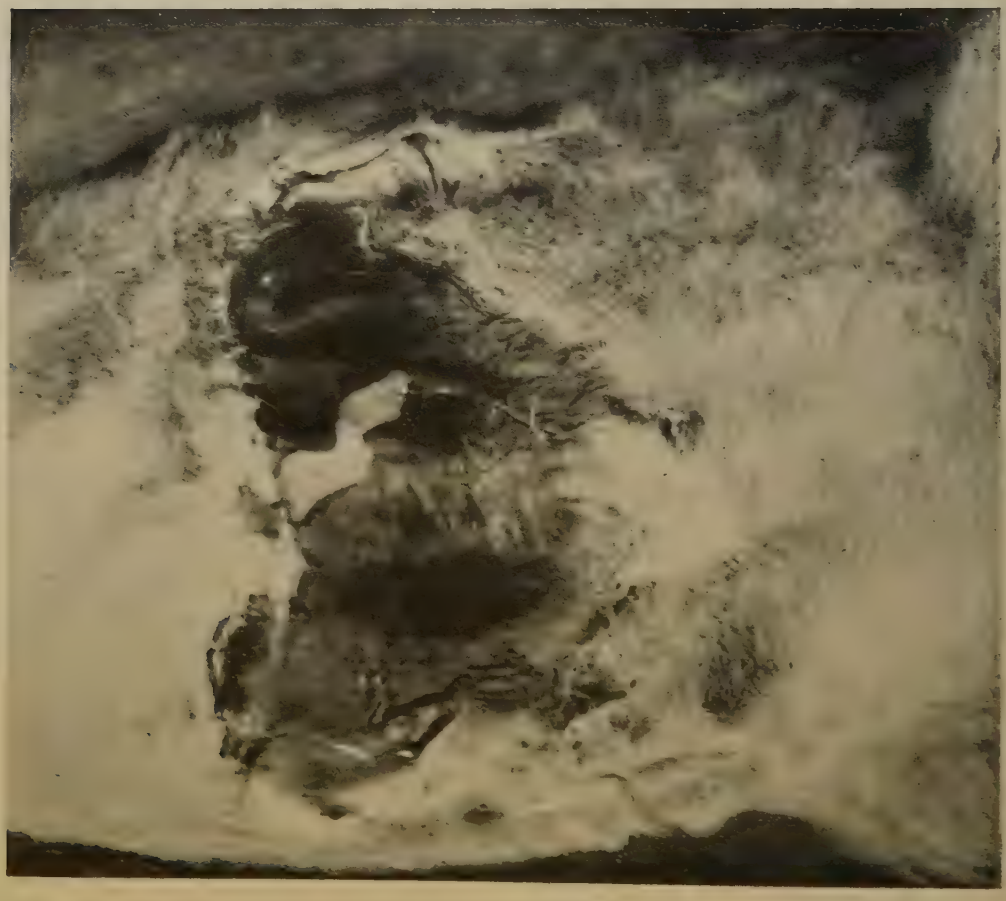
Estampa 7

Cestrum sendtnerianum MART. Designação popular: "Coerana". Desta planta foi extraída uma saponina tóxica. Nos nossos ensaios, em cobaias, mostrou-se tóxica por via peritoneal e gástrica. Produziu sintomas graves em carneiro, na dose de 800 gramas, sob a forma de extrato aquoso.

———o———

15 cm





60 cm

Vol. 14 — Art. 3 Dezembro de 1943

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA BIOLOGIA DA BROCA DO CAFÉ "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERRARI, 1867)" (COL. IPIDAE)

POR

J. Bergamin

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 7 figuras no texto

ÍNDICE

	pags.		pags.
Introdução	31	Prepupa	51
Histórico	32	Ninfa	51
Descrição dos estádios	39	Evolução completa	53
Proporção dos sexos	44	Longevidade e alguns hábitos dos machos	58
Cópula	44	Postura total e longevidade das fêmeas	59
Período de preoviposição	45	Gerações anuais	64
Oviposição	45	Partenogênese	65
Período de oviposição	46	Abstract	67
Duração dos estádios	46	Bibliografia	68
Ovo	46		
Larva	47		

INTRODUÇÃO

A importância alcançada pelo problema da Broca do Café, não sòmente pelo vulto dos prejuizos que causa anualmente ao país, como, ainda, pela área geográfica por ela atingida, levou-nos a estudar alguns detalhes biológicos, dêsse inseto, para sua posterior aplicação nas pesquisas de combate.

Problema de tão relevante complexidade, não pôde ser estudado englobadamente; foi necessário dividí-lo e subdividí-lo para que, depois de conhecidas suas diferentes partes, fossem investigadas as possibilidades de um combate sistemático e eficiente.

Não quisemos, ao iniciar êste estudo, tocar nos pontos que já haviam sido estudados em nosso meio. Pareceu-nos, contudo, que, à vista da adaptação da praga à nova pátria, certos fatos biológicos poderiam ter sofrido os efeitos dessa aclimação. Assim, para que uma bagagem maior de conhecimentos nos auxiliasse, resolvemos encarar o problema em toda a sua extensão, investigando também o que já havia sido feito em nosso país, ou fora dêle.

Nesta primeira publicação, relatamos todos os dados conseguidos em laboratório. O problema começou e continúa a ser estudado no campo. Necessário será que calculemos, com o menor desvio possível,

toda a extensão dos prejuizos que a Broca todos os anos ocasiona ao produto que tem sido e ainda é a base de nossa economia agrícola.

Por auxílio prestado e por sugestões sempre valiosas, agradecemos aos Snrs. H. F. G. SAUER, A. A. de TOLEDO, J. E. TEIXEIRA MENDES, J. C. OLIVEIRA, F. MARCIANO JR. e Srta. M. F. ROSO.

Em vez de tabelas de temperaturas, julgámos preferivel estampar nêste trabalho um gráfico (Figs. 1 e 2), no qual são dadas, diariamente, as temperaturas média, mínima e máxima, durante todo o tempo de nossas observações.

HISTÓRICO

Tudo o que se conhece a respeito da história da Broca do Café faz supôr que tenha sua origem na África Equatorial, região de Uganda, de onde se espalhou depois para outras regiões do continente africano e para outras partes do globo onde se cultiva o café (Java, Sumatra, Indochina, Ceylão), alcançando também o Brasil.

As primeiras referências ao inseto como parasita do café datam de 1867, quando FERRARI classificou e denominou o "*Cryphalus hampei*". A pimeira referência à broca como uma praga do café data de 1901, quando FLEUTIAUX estudou insetos retirados de cerejas de café do Congo. Em 1914 VEUILLET identificou o parasita do café enviado da Libéria, e cuja semelhança com o descrito por FLEUTIAUX assinalou, sendo o "*Stephanoderes coffeae*" HAG., mais tarde denominado "*Stephanoderes hampei*" e atualmente "*Hypothenemus hampei*".

As primeiras medidas contra essa praga, que encontramos referidas na literatura, são as contidas em um decreto de 1922, de SERRATET, Ministro das Colônias da França. No artigo 1.º dêsse decreto está a proibição: da circulação, do armazenamento e do trânsito dos produtos suscetiveis de disseminar o *Stephanoderes*, provenientes de países infestados ou de países que importam café de regiões contaminadas, sem que tenham serviço fitopatológico. A proibição se aplica: à planta e aos fragmentos de planta do cafeeiro, às cerejas de café, frescas ou sêcas, aos grãos, com casca ou descascados, frescos ou sêcos, às caixas de embalagens que serviram ao transporte e, enfim, a todas as plantas e a todos os grãos suscetiveis de abrigar a praga.

O art. 5.º refere-se aos produtos referidos no art. 1.º que procedam de, ou que tenham que transitar por: Indochina, Madagascar, Nova Caledônia, Guadelupe, Martinica, Guiana e África Ocidental Francesa. E' proibida a importação de: Indias Neerlandesas, Antilhas Inglesas, Reunião e África Equatorial Francesa, bem como dos países onde não é proibida a importação dêsses produtos, nem sejam êstes submetidos a controle fitopatológico.

A data precisa da introdução da broca em Java não pôde ser verificada, mas tudo faz crer que o fôsse em 1909 e 1910, em um distrito de Tjiandjoer na parte ocidental, alastrando-se depois, no espaço de 12 anos, por toda a ilha, a-pesar-dos pertinazes esforços empregados para impedir a sua disseminação. A um carnívoro viverrídeo peculiar a essa região zoogeográfica e conhecido localmente por "Loewak", o *Paradoxurus hermaphroditus* SCHREB., que ingere grande quantidade de frutos e deixa passar pelo intestino os caroços contendo a broca viva, foi atribuido papel importante na disseminação da praga.

Só em 1918, segundo RUTGERS e CORPORAAL, apareceu a broca do café na ilha de Sumatra. A invasão se deu a-pesar-de todas as medidas tomadas (expurgo obrigatório das sementes) para impedir a sua importação de Java (Bangelan).

Em Maio de 1924 teve o Govêrno de São Paulo conhecimento de que em fazendas do município de Campinas aparecera uma praga que atacava os cafeeiros, cuja importância para a nossa lavoura poderia ser considerável. A notícia logo se difundiu, dado o interêsse despertado entre os lavradores e a imprensa.

O Govêrno do Estado iniciou imediatamente o exame dos cafezais das fazendas Chácara da Barra, Mato Dentro, Bom Retiro e Lapa, por seu único entomologista, o Dr. ADOLPHO HEMPEL, da Diretoria de Agricultura, que reconheceu a praga como sendo um *Stephanoderes* e portanto merecedor de estudo e cuidado especial, dada a conhecida malignidade de pragas dêsse gênero em outros países.

Essa determinação foi logo confirmada por A. DA COSTA LIMA e ARTHUR NEIVA, que com a literatura de que dispunham, puderam levar o reconhecimento até a determinação da espécie como sendo *Stephanoderes coffeae* HAG., identificando assim a praga que já havia anos vinha causando grandes danos às plantações de Uganda, Java e Sumatra e que, como acima foi dito, em 1914, pela primeira vez, havia sido identificada por VEUILLET em café proveniente do Congo, e para a qual já em 1914 NAVARRO DE ANDRADE havia solicitado a atenção da Secretaria da Agricultura no relatório sôbre sua viagem a Java.

Essa determinação dos técnicos brasileiros foi depois confirmada pelos entomologistas EGGERS, de Stolberg (Alemanha), SAMPSON, do Museu Britânico, VAYSSIÈRE, do Instituto Agronômico de Paris e por outros dos países atacados pela praga.

Sôbre o momento exato e a via de introdução da praga no Brasil nada foi possível apurar de positivo, permanecendo no terreno das conjeturas, sem qualquer base real, tudo quanto sôbre o assunto se tem dito e escrito. A praga só se torna perceptivel após longo tempo. Não

havia, até bem pouco, qualquer organização para a defesa fito-sanitária do país. Plantas, sementes e tudo o mais era importado livremente e muitos agricultores, a título de curiosidade ou de experiência, importavam frequentemente plantas do estrangeiro e assim também dos países atacados pela broca, não sendo possível presumir qual ou quais dessas importações nos trouxeram êsse grande mal.

Realizada a classificação do inseto, e verificado que se tratava de uma das pragas mais sérias do café, foi logo pelo Govêrno constituida uma comissão composta dos Drs. A. NEIVA, A. DA COSTA LIMA e EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, para estudar, no local da devastação, os danos por ela ocasionados e o seu modus vivendi, assim como apresentar um relatório acerca dos conselhos que julgassem oportunos quanto às medidas preventivas contra a praga.

A 10 de Junho de 1924 foi apresentado êsse relatório, pelo qual se verifica que a broca havia invadido os cafezais de cinco municípios, manifestando porém a Comissão a suspeita de que a sua expansão já fôsse muito maior, o que infelizmente logo se confirmou. Já asseveravam então os aludidos técnicos que a faculdade da adaptação do inseto era extraordinária, e consideravam como impossível a sua erradicação dos cafezais de São Paulo.

A área atacada foi dividida em três zonas por uma outra comissão instituida pelo Govêrno e composta de pessoas de grande destaque na lavoura, política e imprensa, orientadas pela comissão de técnicos. A comissão verificou existir uma zona central, considerada a mais atacada, circundada por uma outra de contaminação já verificada, por sua vez circunscrita por uma terceira que abrangia as fazendas limítrofes que se admitia não terem ainda sido atingidas.

Foi determinado que se fizesse imediatamente a colheita, o expurgo e o beneficiamento do café colhido. Trinta dias depois da colheita foi feito um repasse afim de evitar a permanência de frutos na lavoura. Foi determinada ainda a destruição das flores temporãs nos cafeeiros.

Essas operações deveriam ser repetidas nos anos subsequentes, permanecendo tais zonas em constante fiscalização.

No meio das discussões acerca dêsse importante problema sobresaía a opinião dos que, como CARLOS BOTELHO, insistentemente preconizavam a destruição, pelo fogo, dos cafezais dessa região, como medida radical e auspiciosa. A isso se opôs e prevaleceu a opinião de ARTHUR NEIVA, de que, com o grande prejuizo que tal medida acarretaria, ela não encerrava garantia alguma no extermínio da praga, cujos limites de disseminação não podiam ser determinados com segurança,

opinião apoiada, além disso, no insucesso de medidas idênticas anteriormente adotadas em Java.

Foi então organizado o Serviço de Combate à Broca do Café, sob a chefia de ARTHUR NEIVA, que logo verificou a expansão da praga a vários municípios próximos ao de Campinas (Itatiba, Pedreira, Amparo, Piracicaba e Tietê). Entre 104 municípios em seguida inspecionados, 28 foram considerados já atingidos pela praga. Mas uma causa de êrro, posteriormente verificada: a confusão então havida entre "broca" *Stephanoderes hampei* (FERR.) e o caruncho das tulhas "*Araecerus fasciculatus*" (DE GEER) no café beneficiado, diminue consideravelmente o valor das comunicações nessa época divulgadas sôbre a distribuição da praga em São Paulo.

Ao lado dessas preocupações com a disseminação da praga foram feitas pesquisas quanto às possibilidades de vida e multiplicação da praga fora do grão de café; concluiu-se que o *Stephanoderes* pode penetrar em diferentes espécies de sementes, sem todavia aí se multiplicar, representando elas apenas um abrigo; e que, mesmo assim abrigado, o inseto não vive mais de 100 dias. A eliminação ou diminuição dos frutos do cafeeiro pelo repasse durante um prazo maior que êsse, apresentava-se como uma eficiente medida de combate.

Foi iniciado amplo serviço de propaganda junto às Câmaras municipais e entre os lavradores mais interessados no assunto. Às Câmaras municipais foram enviadas amostras de cafés atacados, insetos mortos e instruções quanto ao modo de combater a praga, além de exemplares de um cartaz colorido visando difundir o conhecimento do inseto e o perigo real que êle representava para a lavoura cafeeira. Ainda como medida informativa, foram publicados comunicados que, a princípio semanalmente e mais tarde quinzenalmente, a comissão mandava aos diversos periódicos da Capital, pelos quais era o público informado acerca dos trabalhos em andamento e das medidas aplicadas.

As medidas então aconselhadas foram: "Repasse, eliminação de todos os frutos da árvore e do solo, com ou sem enterramento da terra para isso raspada da superfície em tôrno do pé de café, e catação profilática, quando necessária; — expurgo do café colhido, em sacos ou a granel, em câmaras estanques, pelo bisulfureto de carbono puro, à razão de 300 cc. por metro cúbico de capacidade, durante 12 a 24 horas; secagem do café no terreiro, depois de lavado ou não; fermentação da palha do café e resíduos do beneficiamento, antes de serem utilizados como adubo, ou de sua incineração; expurgo de todos os objetos de uso e roupas dos colonos chegados de fazendas ou zonas infestadas; expurgo de toda a sacaria vasia que transita no Estado; fiscalização de trânsito de

café, plantas e quaisquer objetos que possam transportar a praga, destruição de cafeeiros abandonados existentes nas lavouras ou matas".

Desde o comêço de seus trabalhos teve logo a Comissão de lutar contra a resistência natural, a incompreensão e má vontade de muitos fazendeiros, para a aplicação dessas medidas, que julgavam arbitrárias e ilegais. Assim tornou-se necessário que as medidas de defesa sanitária vegetal, autorizadas pela legislação federal, fossem também executadas pelos funcionários estaduais, dentro dos limites do território paulista, de acôrdo com o decreto n.º 16.500 de 21/6/24 expedido pelo Govêrno da República, a pedido do Govêrno do Estado, bem como todas as outras que de futuro se tornassem aconselhaveis.

Para atenuar as consequências da incompreensão por parte de muitos lavradores, dos quais êsses serviços eram exigidos, a comissão distribuiu publicações para orientá-los, o que deu bons resultados entre os mais instruidos. Destinado aos pequenos lavradores e sitiantes, constituidos geralmente por antigos colonos pouco letrados, foi publicado e largamente distribuido um trabalho destinado às escolas rurais: — "História de um bichinho malvado" de autoria de RODOLPHO VON IHERING, escrito em forma de narrativa popular, para que as crianças pudessem repetí-la aos pais, interessando-os no assunto.

Muito trabalhoso para a Comissão foi conseguir que o fazendeiro aprendesse a distinguir ou aceitasse como distinta a nova praga, a broca do café *(Stephanoderes hampei)*, do "caruncho das tulhas" *(Araecerus fasciculatus)*, também conhecido dos plantadores de café no Estado de São Paulo e das demais zonas cafeeiras do país.

Também com o *Hypothenemus plumeriae* (NÖRD., 1856) *(Stephanoderes seriatus* EICHHOFF, 1871) inseto muito difundido desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil, houve muita confusão, dada a grande semelhança entre êste inseto e a broca do café. Por parte de adversários políticos do govêrno e pessoas infensas ao serviço houve leviana exploração dessa confusão, insinuando-se que se tratava de uma praga velha nos cafezais paulistas, que não oferecia o perigo que lhe queriam emprestar, e portanto não justificava as medidas nem as despesas exigidas para o seu combate.

Há realmente em nossa fauna várias espécies de *Stephanoderes* muito próximos à verdadeira "broca do café" *(Hypothenemus hampei* FERR.). E' tal a semelhança entre essas espécies que qualquer pessoa leiga poderá supôr tratar-se de uma única. Por êsse motivo as observações e afirmações dessas pessoas e mesmo de técnicos, quando não especializados, não podem ser aceitos com a mesma confiança que as verificações realizadas por especialistas no assunto, dedicados ao estudo desta praga.

Em Março de 1925 foram postos em execução o regulamento e a lei (2.020 de 26/12/24) que crearam a Comissão de Estudo e Debelação da Praga Cafeeira, remodelando o primitivo Serviço de Defesa do Café.

Para demonstrar a eficácia das medidas aconselhadas e justificar o rigor com que exigia a sua aplicação, a Comissão tomou a seu cargo o serviço de ataque em vários talhões das fazendas mais infestadas do município de Campinas, onde não fôra possível encontrar, durante a colheita do ano anterior, uma única árvore que não estivesse fortemente atacada, tendo chegado a atingir 89,8 a porcentagem dos frutos contaminados. Todo o cafezal foi por três vezes cuidadosamente repassado por pessoal da Comissão. O resultado foi verificado de modo incontestavel após a colheita que se seguiu imediatamente ao primeiro repasse.

Apresentando dados concretos, obtidos em diversas propriedades cafeeiras do Estado, em que o repasse fôra executado de modo rigoroso e por custo verdadeiramente insignificante, o que foi confirmado por inquérito feito entre os proprietários das fazendas mais atacadas de diversos municípios de S. Paulo, a Comissão demonstrou também não haver razão para se alegar o custo elevado de tal operação.

Correlativamente às medidas diretas de combate ao inseto nos cafezais, tornou-se necessário submeter o café colhido a um processo de expurgo que eliminasse a maior quantidade possível de broca no interior dos frutos. Foram estudados tipos adequados de câmaras de expurgo, escolhendo-se o bissulfureto de carbono como sendo o inseticida mais indicado para o caso. Foram examinadas as diversas marcas dêsse inseticida quanto à sua influência no gosto do café, e verificada a quantidade aconselhavel (300 cc.) por metro cúbico.

Foi exigida a construção de câmaras de expurgo nas fazendas, onde o café colhido durante o dia era alí depositado para ser submetido àquele tratamento profilático durante 12 a 24 horas. Até Setembro de 1927, nos 19 municípios contaminados, havia perto de 3.000 câmaras construidas para êsse fim.

Outra medida profilática tomada contra a possível contaminação de municípios ainda não invadidos pelo inseto, foi a do expurgo de sacaria vasia usada na colheita e em trânsito por qualquer parte do território do Estado. Êste serviço, realizado em diversos pontos do Estado, demandava despesas para a sua eficiência, mas não era gratuito, sendo as despesas cobertas pela cobrança de uma taxa de 25 réis por saco expurgado.

Como medida complementar foi também exigida a destruição dos cafeeiros abandonados, por constituirem perigosos focos da praga.

A propaganda das medidas necessárias ao combate à broca do café foi feita não só por meio de cartazes e folhetos, mas também com o auxílio de um filme cinematográfico exibido em numerosos teatros.

A parte infestada do Estado foi dividida em zonas de vigilância, que eram percorridas por inspetores fiscais encarregados de examinar a marcha e intensidade da infestação e fiscalizar o expurgo do café.

Em 1927 foi publicado pela comissão um trabalho sôbre a biologia da broca e outro sôbre os trabalhos de combate à praga até então realizados.

Quando em 1928 a comissão de debelação da praga cafeeira foi incorporada ao Instituto Biológico, então fundado, os trabalhos de combate à praga prosseguiram sem alteração.

Em 1929 foi enviado à África o entomologista do Instituto Dr. ADOLPH HEMPEL que de Uganda trouxe alguns exemplares vivos da vespa *Prorops nasuta*, conhecido inimigo da broca do café, que foi aquí criado e multiplicado em laboratório e depois disseminado em grande quantidade pelas culturas de café.

Em 1933 foi instituida pelo Diretor Superintendente uma comissão de técnicos dêste Instituto, encarregada do estudo da praga e da orientação dos trabalhos de combate e defesa contra a mesma broca, que reunia todos os que nêste país se haviam dedicado ao seu estudo e se tinham familiarizado com o seu combate. Por várias vezes foram convocados representantes dos mais destacados da lavoura cafeeira para tomar parte nas reuniões dêsses técnicos do I. Biológico.

Tanto a eficiência dos meios de combate adotados para reduzir consideravelmente os prejuizos causados pela praga, quanto a impossibilidade de a debelar completamente de modo a extinguí-la ou mesmo de impedir-lhe a disseminação por toda a cultura cafeeira, foram sempre unânimemente reconhecidas, concentrando-se porisso a ação do Instituto nos processos capazes de dificultar e retardar essa disseminação, na divulgação e demonstração dos meios de combate comprovadamente capazes de reduzir a um mínimo inapreciavel os prejuizos causados pela praga, na criação e distribuição da vespa de Uganda como inimigo natural da broca do café e no estudo da biologia dêsses dois insetos, à procura de novos conhecimentos de utilidade para o combate à praga.

Nêste terreno representa o nosso trabalho uma contribuição ao conhecimento da broca. Outros trabalhos da nossa Secção tiveram por fim e conseguiram estudar e aperfeiçoar os processos de criação, tanto da broca como da vespa, em laboratório, visando o objetivo prático imediato de distribuir a vespa pelos cafezais no momento mais

oportuno para o combate à broca. Êsse momento é, segundo mostraram as últimas investigações, o do desequilíbrio que existe na natureza entre a população inicial da broca e a da vespa, em todas as safras.

Com a evolução da organização do I. Biológico, os trabalhos sôbre a broca do café foram divididos principalmente entre a Secção de Defesa Fitossanitária, a cujo cargo estão as medidas de combate à praga, e a de Entomologia Agrícola, encarregada de estudar a biologia do inseto e a de seus inimigos naturais como base para a evolução dos processos de defesa da cultura cafeeira.

DESCRIÇÃO DOS ESTÁDIOS

OVO

A forma e as dimensões dos ovos de *Hypothenemus hampei* variam com as condições em que são postos. Em condições normais de umidade e de temperatura, as dimensões variam entre limites estreitos. Essas condições normais correspondem a uma temperatura de mais ou menos 25°C. e a umidade relativa próxima de 100%. Os ovos produzidos em tal ambiente podem ser chamados normais e são encontrados no campo, em frutos maduros, nos meses de Fevereiro a Junho-Julho (Tabela 1). Apresentam forma elíptica, ou levemente ovóide, com cutícula brilhante.

Normalmente não há posturas em frutos sêcos. Mas quando isso acontece, os ovos são mais compridos do que os normais (Tabela 1), que faz com que apresentem forma cilindróide, com cutícula leitosa e brilhante.

De raro em raro são encontrados, em posturas normais, ovos que apresentam dimensões muito menores. Êsses ovos pequenos, segundo foi apurado, são estereis.

Dimensões — As dimensões média, mínima e máxima de 150 ovos constantes da tabela 1, são as encontradas para as três categorias acima descritas.

Tabela 1

Dimensões dos ovos expressas em mm

Ovos	Eixo maior			Eixo menor			Num. total de
	média	mínima	máxima	média	mínima	máxima	
Normais	0,599	0,52	0,69	0,314	0,28	0,35	78
Alongados	0,760	0,70	0,84	0,311	0,28	0,34	67
Pequenos	0,498	0,44	0,56	0,250	0,23	0,26	5

Foram conseguidas também várias dezenas de ovos de fêmeas virgens, que diferem dos fecundos por apresentarem cutícula leitosa, sem brilho. São todavia de dimensões normais.

Dos ovos cilindróides, retirados de café com pouca umidade, não saíram larvas maiores como era de esperar e sim larvas de dimensões normais.

LARVA

Ao nascer, a larva apresenta os seguintes caracteres:

Cápsula pouco mais larga do que o resto do corpo, de coloração amarelo-palha e bem distinta do resto do corpo, com os bordos levemente recurvados. Largura média da parte mais dilatada — 240 micra. Sutura mediana longitudinal, visivel. Mandíbulas visiveis, de dimensões regulares, dirigidas para a frente. Coloração parda.

Corpo mais largo na região torácica, afilando-se para a extremidade posterior; direito, na larva recem-nascida, com segmentos mais ou menos distintos. Pêlos esparsos, não muito alongados, dirigidos para trás. Ausência de patas.

Dimensões — Para as larvas recem-nascidas foram encontradas as dimensões seguintes, tomadas em 10 indivíduos e expressas em mm: comprimento do corpo: médio 0,79; mínimo 0,72; máximo 0,84: largura da cápsula: média 0,240; mínima 0,230; máxima 0,250.

Quando completamente desenvolvidas, antes da prepupação, as larvas atingem de 1,88 a 2,30 mm, com média de 2,12 mm.

PREPUPA

Cápsula inteiramente semelhante à das larvas. Corpo inteiramente branco-leitoso, sem as manchas escuras observadas, por transparência, no interior do corpo da larva.

O comprimento médio do corpo das prepupas é de 2,05 mm para as femininas, com extremos de 2,00 a 2,12 mm, e de 1,4 mm para as prepupas masculinas, com variações de 1,34 a 1,50 mm.

NINFA

Nos três ou quatro primeiros dias, a ninfa apresenta, em todo o corpo, coloração branca. Na cabeça, que é encoberta pelo pronoto, notam-se, livres e distintas, as antenas e as peças bucais, que até o quarto dia são inteiramente brancas. No torax, na parte tergal, com prolongamento para os flancos, são vistos os élitros, com sua aparência sulcada. Na parte ventral, bem arranjadas, estão as patas.

Dimensões — As dimensões dadas na tabela 2 são de ninfas femininas e masculinas. A largura foi tomada no terço posterior do pronoto.

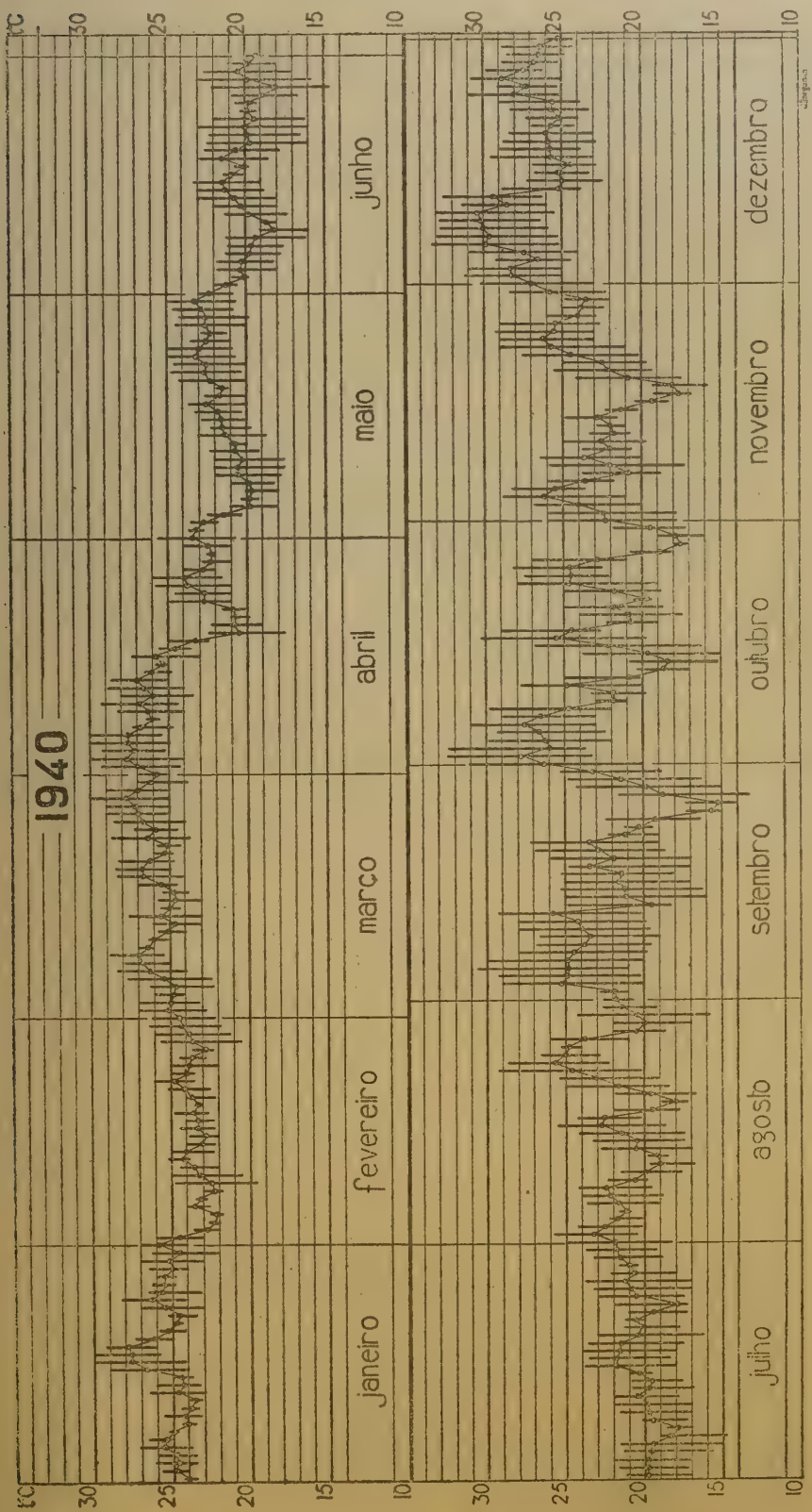


Fig. 1 — Temperaturas máximas, médias e mínimas diárias, do ano de 1940.

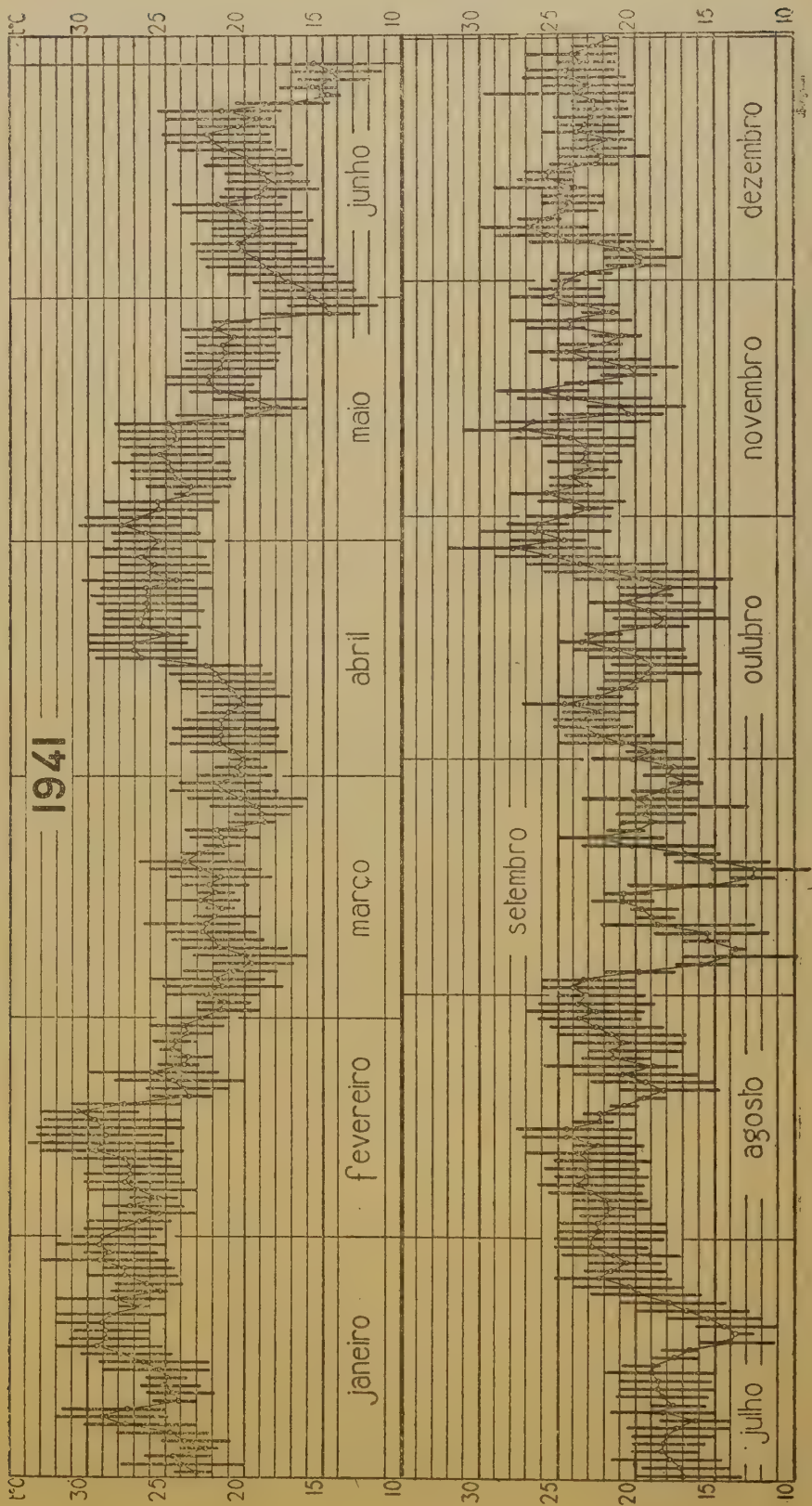


Fig. 2 — Temperaturas máximas, médias e mínimas diárias, do ano de 1941.

Tabela 2

Comprimento e largura das ninfas femininas e masculinas

Ninfas	Comprimento em mm			Largura em mm			Num. total de
	média	mínima	máxima	média	mínima	máxima	
Femininas	1,84	1,70	2,00	0,715	0,65	0,77	100
Masculinas	1,35	1,26	1,42	0,521	0,48	0,56	26

No último segmento abdominal das ninfas, tanto masculinas como femininas, notam-se dois apêndices afilados, recurvados e ponteagudos: são os *cerci*, absolutamente ausentes nas larvas e nos adultos.

ADULTO

O adulto apresenta, ao nascer, uma coloração amarelo-palha, bem clara, e é de consistência muito fragil. Permanece na câmara em que nasce, ao lado da exúvia ninfal, durante 3 ou 4 dias. Nessa idade o corpo já está mais endurecido e mais escuro, e tem início à atividade sexual.

Caracteres Gerais

Não nos preocupou muito o estudo puramente morfológico da Broca. Muitas são as publicações que descrevem, com fartura de detalhes, sua morfologia. Dentre os trabalhos mais valiosos, citamos o de PIZA JUNIOR, donde tirámos a ligeira descrição que segue:

Fêmea — "Corpo alongado, cilyndrico, ligeiramente recurvado para a região ventral, de côr preta luzidia".

"A cabeça, situada ventralmente, é protegida pelo pronoto, em cujo bordo anterior se acha embutida. E' globular, e, quando destacada, deixa ver superiormente, na região occipital, escondida sob o prothorax, um apice cônico, visivel também por transparência nos indivíduos macerados montados em balsamo entre a lamina e a lamella".

Dimensões — Foram medidos 100 indivíduos, no sentido do comprimento, no da largura (bordo posterior do pronoto) e no da altura (do metasterno à superfície dorsal dos élitros). A tabela 3 encerra essas dimensões.

Tabela 3

Dimensões médias, mínimas e máximas dos adultos, tomadas de 100 femeas e 15 machos

Dimensões em mm	Média		Mínima		Máxima	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Comprimento	1,65	1,18	1,50	1,07	1,78	1,24
Largura	0,73	0,55	0,66	0,51	0,80	0,62
Altura	0,67	0,51	0,62	0,49	0,73	0,54

Macho — Assemelha-se à fêmea em seu todo. E', porém, muito menor. Mesmo isolado, facilmente se reconhece um macho. Em conjunto, numa população, distingue-se imediatamente.

O macho apresenta apenas vestígios de asas membranosas, motivo por que é incapaz de voar.

PROPORÇÃO DOS SEXOS

Pelas contagens dos indivíduos criados em tubos fechados, nos quais haviam sido isoladas fêmeas na razão de uma para cada tubo, foi possível estabelecer uma proporção sexual formada por todos os descendentes de cada fêmea. As prepupas, as ninfas e os adultos de cada sexo foram para êsse fim separados.

Em 2.850 indivíduos examinados, 265 eram machos e 2.585 fêmeas, ou seja 1 macho para 9,75 fêmeas. A porcentagem de machos numa população é, pois, de 9,3%. A-pesar-de ser baixa a relação, todas as fêmeas coletadas em café, tanto de criação de laboratório como do campo, são fecundas. Afastada como já está a hipótese da reprodução partenogenética, podemos afirmar, ante êsses dados, que um macho fecunda 10 fêmeas em média.

A proporção dos sexos acima apresentada foi estabelecida pela separação de diversos lotes de indivíduos que se criaram em ambiente que não puderam abandonar. E', pois, a proporção estabelecida para a totalidade dos indivíduos de várias proles. OLIVEIRA FILHO encontrou, em exames procedidos em frutos do campo, uma média de 1 macho para 5,7 fêmeas. LEEFMANS em Java, encontrou 27.734 fêmeas para 692 machos, ou seja 1 macho para 40 fêmeas, ou ainda 97,5% de fêmeas, aproximadamente. LEEFMANS chegou a encontrar, em certas épocas, até 10 ou 12% de machos.

CÓPULA

Raro é o fruto broqueado que, contendo uma população normal, não contem macho. Os primeiros indivíduos a nascer, em uma prole, em geral são machos. Pode-se admitir que os machos completam antes o seu desenvolvimento para que as fêmeas, logo que se tornem sexualmente ativas (3 ou 4 dias após a passagem a adulto) possam ser fecundadas.

Temos verificado que 100% das fêmeas que abandonam naturalmente os frutos em que se criaram sem quaisquer empecilhos, são fecundas. Isso indica seguramente que a cópula se verifica, normalmente, a partir do quarto dia do nascimento das fêmeas, nos frutos em que se criaram.

PERÍODO DE PREOVIPOSIÇÃO

O período de preoviposição está em íntima relação com a cópula e com o ambiente que a fêmea recem-copulada encontra. Uma fêmea, à qual se dê ambiente favorável logo depois de copulada, inicia a postura assim que conclua a câmara que todas elas preparam. Para esta operação não são necessários mais do que 2 ou 3 dias. Si para a Broca do Café houvesse número igual de machos e de fêmeas, não necessitando estas esperar, como acontece, alguns dias para a fecundação, poder-se-ia afirmar ser o período de preoviposição restringido aos dias necessários para o endurecimento do corpo (3 ou 4) e abertura da galeria (2 ou 3 dias). Sendo porém os machos em número muito inferior, as fêmeas são obrigadas a esperar pela cópula, pois cada macho não fecunda mais de duas fêmeas por dia.

Assim sendo, o período de preoviposição pode ir de 5 a 10 ou mais dias. As fêmeas jovens da tabela 10 iniciaram a atividade ovipositora aos 8 dias de idade. Inclue-se nêsses 8 dias o período de prefecundação. Não obstante ser um período de espera forçada, as fêmeas ainda virgens permanecem no fruto de criação e são dotadas de grande mobilidade e de notável inquietação. Verificada a cópula, nos meses em que há frutos de safra, antes da colheita, portanto, as fêmeas abandonam a semente que destruiram e vão em busca de um fruto são, para iniciar a postura.

OVIPOSIÇÃO

A Broca só põe no interior da semente do café. Para isso abre um orifício, que partindo da corôa do fruto alcança uma das sementes. Perfurada a semente, ela abre uma galeria, que é alargada e transformada em câmara, na qual a Broca deita seus ovos.

Em geral a oviposição começa quando os frutos se tornam bem granados (Janeiro-Fevereiro). Não obstante não haver interrupção reprodutora em ambiente favorável, verifica-se que na natureza, logo após a colheita, por não haver frutos que ofereçam boas condições para a postura e desenvolvimento das proles, cessa a Broca sua atividade até a nova frutificação dos cafeeiros.

A oviposição é regular até 15 ou 20 dias após o seu início, diminuindo, depois, de intensidade. Em condições favoraveis de temperatura e umidade, a Broca é capaz de pôr de 2 a 3 ovos diários (tabela 10). Do 20.º dia em diante a postura vai decrescendo até cessar completamente, permanecendo a fêmea no interior do fruto enquanto dure a evolução de seus descendentes, para reiniciar, em outro fruto, as posturas interrompidas.

Sómente depois de bem granadas oferecem as sementes bôas condições para postura. Frutos muito verdes, ainda aquosos, a-pesar-de perfurados pela Broca, nunca encerram ovos.

PERÍODO DE OVIPOSIÇÃO

O período ativo é muito variavel de fêmea para fêmea. A oviposição, que tem início de 5 a 10 ou mais dias após a passagem a adulto, cessa alguns dias antes da morte do inseto.

A vida média de fêmea é de 156,6 dias, durando o período ativo 131 dias. Nêsses 131 dias estão compreendidos intervalos, às vezes bastante longos, em que a fêmea não põe. Tais intervalos, que na natureza variam de acôrdo com a época (existência ou não de frutos novos), compreendem o tempo que decorre desde que a fêmea povoa um fruto (11 a 20-25 dias) até o dia em que, tendo perfurado outro fruto, inicia nêle novas posturas.

Os dados que constituem a tabela 13, relativa à longevidade e à fecundidade das fêmeas, indicam que uma mesma fêmea é capaz de produzir proles durante os 5 ou 6 meses de uma safra.

DURAÇÃO DOS ESTADIOS

OVO

A determinação da idade certa dos ovos, isto é, do dia da postura, para o cálculo do período da incubação, foi feita de maneira seguinte:

Em caixas de Petri de 240 mm de diâmetro, foi colocado café, despolpado ou não. A umidade foi mantida sempre constante, o que garantiu às sementes as mesmas condições do café maduro. As fêmeas necessárias para uma infestação artificial, na razão de duas por semente, foram retiradas de café infestado, da lavoura, ou da criação de laboratório. A partir da penetração das fêmeas, foram feitos três exames diários em cerca de 20 sementes, até que aparecessem os primeiros ovos. Isto verificado (em geral 48 a 60 horas após a infestação), foram abertas todas as sementes de cada ensaio e retirados os ovos encontrados.

Os ovos assim obtidos foram passados para caixas de Petri de 40 mm de diâmetro, improvisadas em câmaras de incubação.

Os ovos foram examinados todos os dias, de manhã. Iniciada a eclosão, de cada caixa foram retiradas as larvas eclodidas nas 24 horas anteriores e anotados, para cada lote, os períodos mínimo, máximo e médio de incubação. A tabela 4 mostra o período de incubação de 1.319 ovos, bem como a influência das temperaturas sôbre ela.

Tabela 4

Período de incubação, em diferentes épocas do ano, de 1319 ovos
Incubação média, 7,6 dias — Temperatura média, 23,1° C.

Lotes	Período de observação		N.º de ovos	Duração do estádio em dias			Temperaturas em T° C		
	Fim da	Postura eclosão		Média	Mínima	Máxima	Média	Mínima	Máxima
1	30- 7-40	10- 8-40	125	8,2	5	11	21,4	16,9	25,8
2	2- 8-40	13- 8-40	202	8,8	7	11	21,6	16,8	29,1
3	6- 9-40	17- 9-40	251	7,7	6	11	22,7	16,0	29,2
4	26- 9-40	5-10-40	120	6,8	6	9	24,1	13,1	32,3
5	15-11-40	25-11-40	94	8,1	6	10	22,4	15,8	29,2
6	11-12-40	18-12-40	70	6,6	5	7	25,8	22,3	32,5
7	19-12-40	27-12-40	113	6,0	5	8	26,6	23,0	31,0
8	21- 2-41	1- 3-41	43	6,5	5	8	23,8	19,0	29,9
9	29- 3-41	7- 4-41	60	6,6	5	9	21,0	17,2	24,9
10	24- 5-41	9- 6-41	48	15,1	13	16	18,7	11,5	24,0
11	19- 6-41	24- 6-41	95	4,7	4	5	27,0	constante	
12	" " "	29- 6-41	98	8,2	6	10	22,0	»	

Pelos dados da tabela 4 verifica-se que a temperatura tem grande influência na duração do período de incubação. Êste vai de 4 (27°C.) a 16 dias (18,7° C.). Êsses dados diferem um pouco dos obtidos por LEEFMANS, em Java e por OLIVEIRA FILHO em S. Paulo: o período médio de incubação encontrado por LEEFMANS é de 6 dias; não há referência à temperatura. OLIVEIRA FILHO dá como período de incubação de 8 a 16 dias, com temperaturas de 10 a 28°C.

Observado ao binocular algumas horas antes da eclosão, o ovo, que se tornou amarelado, mostra em seu interior, por transparência, a larva já bem formada. Percebem-se todos os movimentos da pequena larva envolta pelo cório, bem como suas várias tentativas para rasgar a película com as mandíbulas. Isso conseguido, abre ela um orifício pelo qual consegue abandonar a película do ovo.

LARVA

DESENVOLVIMENTO LARVAL

O estudo do desenvolvimento larval teve o seguinte curso: as larvas recem-nascidas, sempre em número bastante acima do necessário, foram introduzidas em uma galeria não muito raza, aberta artificialmente em sementes de café. Para facilidade de manipulação, o

número de larvas de cada semente nunca passou de cinco. Foram assim organizados vários lotes, que permaneceram em ambiente saturado de umidade e à temperatura ambiente. Vários exames foram feitos a partir do 7.º dia do nascimento das larvas, para verificar o aparecimento das primeiras prepupas. À medida que o número destas aumentava, era aberta maior quantidade de sementes e retiradas todas as prepupas, que foram grupadas em lotes, segundo a idade. De todos os lotes de prepupas foram retiradas as ninfas no dia de seu aparecimento. Por êsse processo conseguiu-se apreciar o desenvolvimento das 358 larvas constantes da tabela 5.

Tabela 5

Período larval e influência da temperatura sôbre sua duração

Temperaturas	T° C	Evolução em dias			Número de larvas
		Média	Mínima	Máxima	
Constante	27,0	12,5	9	17	141
	22,0	15,5	12	20	52
Variavel	21,8	15,4	12	20	119
	28,4	11,5	9	14	46
Médias e total	24,8	13,8			358

O desenvolvimento larval em Java, segundo LEEFMANS, variou de 10 a 21 dias, com média de 14. Não há referência à temperatura. Em S. Paulo, OLIVEIRA FILHO encontrou de 14 a 27 dias, variando a temperatura de 10 a 28°C.

MUDAS

Pela medida da largura das cápsulas, foi possível estabelecer o número de mudanças de pele para as larvas do *Hypothenemus hampei*. Como para o estudo do desenvolvimento larval, foram organizados vários lotes com larvas recem-nascidas. Todos os dias foram distendidas 10 larvas sôbre lâmina, para verificar a largura da cápsula de cada uma. As medidas foram tomadas ao microscópio, com ocular micrométrica.

Foram medidas as cápsulas de 160 larvas, em 16 dias e os dados obtidos e constantes da tabela 6 revelam que, sendo favoraveis as condições, as larvas mudam a partir do 4.º dia após o nascimento, e sómente em larvas femininas se verifica a muda, pois as masculinas despem a pele pela primeira vez ao passarem à ninfose. Há, portanto, dois "instars" para as larvas femininas e apenas um para as masculinas.

A duração da muda vai de 3 a 10 minutos.

Tabela 6

Medidas da largura da cápsula, em mm, para a verificação do número de mudas
Temperaturas em t° C. — Média 25,5; mínima 20,5; máxima 30,6

Idade	Recem-nascidas		1 dia		2 dias		3 dias	
	Largura da Cápsula	Comprim. do Corpo	Largura da Cápsula	Comprim. do Corpo	Largura da Cápsula	Comprim. do Corpo	Largura da Cápsula	Comprim. do Corpo
	0,238	0,80	0,240	0,88	0,238	1,20	0,250	1,10
	0,240	0,74	0,240	0,98	0,230	0,96	0,230	1,26
	0,230	0,72	0,240	1,16	0,240	1,30	0,252	1,24
	0,240	0,80	0,240	1,14	0,240	1,14	0,236	1,12
	0,244	0,84	0,250	0,86	0,244	1,20	0,240	1,20
	0,240	0,80	0,240	1,07	0,250	1,30	0,220	1,00
	0,250	0,84	0,236	0,95	0,238	1,14	0,240	1,06
	0,246	0,76	0,238	0,96	0,240	1,08	0,240	1,12
	0,236	0,80	0,240	1,14	0,250	1,10	0,240	1,10
	0,236	0,80	0,240	0,96	0,228	0,90	0,240	1,16
Média	0,240	0,79	0,240	0,91	0,239	1,13	0,238	1,13
Temp. média	26,2		24,3		26,0		25,7	

Idade	4 dias			5 dias			6 dias			7 dias		
	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo
	1.° instar	2.° instar		1.° instar	2.° instar		1.° instar	2.° instar		1.° instar	2.° instar	
	0,240		1,50		0,330	1,48	0,240		1,32		0,330	1,40
	0,226		1,20	0,246		1,30		0,340	1,52		0,320	1,50
	0,240		1,47	0,236		1,46		0,338	1,72		0,328	1,30
	0,230		1,20		0,334	1,50		0,324	1,40		0,340	1,52
	0,236		1,46	0,240		1,48		0,320	1,40		0,336	1,44
	0,248		1,32		0,340	1,54		0,340	1,56		0,340	1,58
	0,240		1,38		0,330	1,58		0,340	1,40		0,340	1,50
	0,244		1,24	0,230		1,24		0,340	1,54		0,330	1,46
	0,230		1,20	0,240		1,22		0,330	1,30		0,320	1,40
		0,338	1,60	0,226		1,30		0,340	1,28		0,340	1,70
Média	0,237	0,338	1,35	0,236	0,333	1,41	0,240	0,334	1,44		0,332	1,48
Temp. média	26,6			26,0			25,4			26,2		

Tabela 6 (Continuação)

Medidas da largura da cápsula, em mm para a verificação do número de mudas
Temperaturas em t° C. — Média 25,5; mínima 20,5; máxima 30,6

Idade	8 dias			9 dias			10 dias			11 dias		
	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo	Cápsula		Corpo
	Prep. ♂	2.° instar		Prep. ♂	2.° instar		Prep. ♂	2.° instar		Prep. ♂	2.° instar	
	0,240			0,230			0,244			0,240		
		0,340	1,70	0,240				0,324	1,80		0,340	2,00
		0,330	1,68		0,330	1,76		0,340	1,82		0,328	1,80
		0,320	1,50		0,330	1,78		0,336	2,00		0,330	2,10
		0,320	1,48		0,320	1,74		0,320	1,92		0,332	2,04
		0,328	1,56		0,328	1,80		0,336	1,94		0,330	2,06
		0,340	1,58		0,340	1,64		0,330	1,78		0,320	2,00
		0,340	1,60		0,340	1,78		0,336	1,82		0,330	2,20
		0,330	1,50		0,336	1,68		0,340	2,00		0,336	2,24
		0,340	1,54		0,330	1,70		0,330	1,78		0,330	2,16
Média	0,240	0,232	1,57	0,235	0,331	1,73	0,244	0,332	1,87	0,240	0,330	2,06
Temp. média	27,9			26,8			25,4			25,5		

Idade	12 dias			13 dias				14 dias				15 dias			
	Cápsula		Corpo	Cápsula		Ninfas	Corpo	Cápsula		Ninfas	Corpo	Cápsula		Ninfas	Corpo
	Prep. ♂	2.° instar		Prep. ♀	2.° instar			Prep. ♀	2.° instar			Prep. ♀	2.° instar		
	0,236			0,340				0,330				0,320			
	0,240			0,336				0,328				0,326			
		0,320	2,04	0,330				0,330				0,336			
		0,340	2,00	0,326				0,340				0,320			
		0,330	2,00		0,334		2,12		0,320		2,10	0,330			
		0,340	2,06		0,330		2,12		0,340		2,10	0,340			
		0,320	1,98		0,340		2,10		0,334		2,08		0,328		2,12
		0,330	2,00		0,320		2,12		0,330		2,00		0,334		2,08
		0,338	2,06		0,320		1,90			♀				♀	
		0,340	2,04			♂	1,36			♂				♀	
Média	0,238	0,332	2,02	0,333	0,329		1,95	0,332	0,331		2,07	0,329	0,331		2,10
Temp. média	23,6			23,3				24,4				24,6			

PREPUPA

A prepupa marca o fim do estádio larval. Atingindo o completo desenvolvimento, a larva prepara a câmara ninfal, isolada do resto da galeria onde viveu. Expele todo o conteúdo do tubo digestivo e passa a prepupa.

O período prepupal é curto. À temperatura de 22 a 27°C. é de 2 dias e de 18 a 21°C. dura 3 a 6 dias.

NINFA

Saída da pele prepupal, a Broca entra em ninfose. Êsse estádio, segundo foi apurado em laboratório, tem uma duração variável, de acôrdo com a temperatura. A variação, porém, nunca é tão ampla como para a evolução embrionária ou larval. A umidade deixa de exercer primacial importância, pois as ninfas, sôbre lâmina, em ambiente com umidade relativa baixa, logram atingir o estádio adulto.

A duração encontrada para a ninfose vai de 4 a 10 dias. A observação foi feita em 138 ninfas, divididas em 3 lotes. Damos na tabela 7 a duração da ninfose, segundo a temperatura.

Tabela 7
Período ninfal e influência das temperaturas sôbre sua duração

Temperatura média em T° C	Duração da ninfose em dias			Número de ninfas
	Média	Mínima	Máxima	
28,7	5,8	4	7	80
26,0	6,3	5	8	33
22,8	7,2	5	10	25

Normalmente a ninfa permanece imóvel no interior da câmara. Quando molestada, porém, executa movimentos em todos os sentidos, com a parte posterior do abdomen. Por meio dêsses movimentos consegue virar-se dentro da câmara.

Quasi no têrmo da ninfose, há uma lenta mudança de coloração. Todos os apêndices, olhos inclusive, começam a tomar uma coloração amarelada; pouco depois passa essa coloração a castanho-clara, escurecendo certas partes mais do que outras. Nas fêmeas, as extremidades dos élitros, dispostos como estão junto aos flancos, parecem de uma côr cinza. São, todavia, transparente-hialinas, com tonalidades amareladas, deixando que se vejam as asas membranosas acinzentadas.

Algumas horas antes do nascimento do adulto, já perde a ninfa toda a primitiva aparência. Sob o tegumento ninfal, que agora nada

Tabela 8 — 1.ª Série

Resultados das contagens procedidas em frutos a amadurecer, isolados em tubos, infestados artificialmente e conservados em meio ambiente. Temperatura média: 19,2°C. Data da infestação: 22-5-41. Início da postura: 27-5-41

Data do exame	Dias de postura	Desenvolvimento da população média por fruto									Postura por fêmea					
		Ovos	Larvas		Prepupas		Ninfas		Adultos		Total			Diária		
			1.º instar	2.º instar	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	méd.	mín.	máx.	méd.	mín.	máx.
28 - 5 - 41	1	1,50									1,50	0	3	1,50	0	3
30 - 5 - 41	3	2,50									2,50	0	6	0,83	0	2
3 - 6 - 41	7	4,00									4,00	0	7	0,57	0	1
6 - 6 - 41	10	10,10									10,10	8	12	1,01	0,80	1,20
8 - 6 - 41	12	10,25									10,25	6	13	0,85	0,50	1,08
11 - 6 - 41	15	12,55	0,20								12,75	9	17	0,85	0,60	1,13
16 - 6 - 41	20	12,00	2,33								14,33	12	16	0,72	0,60	1,33
20 - 6 - 41	24	11,48	6,02								17,50	13	19	0,73	0,54	0,82
24 - 6 - 41	28	11.00	9,00								20,00	14	22	0,72	0,50	0,78
28 - 6 - 41	32	11,00	9,00	3,33							23,33	15	34	0,72	0,47	1,06
2 - 7 - 41	36	7,50	12,00	8,00							27,50	23	30	0,76	0,64	0,86
6 - 7 - 41	40	4,33	8,33	13,66							26,32	18	38	0,66	0,45	0,95
12 - 7 - 41	46	2,40	9,60	9,60	0,00	0,20					21,80	18	24	0,49	0,50	0,66
18 - 7 - 41	52	5,33	6,33	10,66	0,33	2,33	0	0,33			25,31	18	35	0,49	0,35	0,67
24 - 7 - 41	58	1,50	8,50	13,00	1,50	6,00	0,50	1,75			32,75	20	42	0,56	0,34	0,72
1 - 8 - 41	66	4,25	3,25	4,50	0,00	1,75	0,50	8,25	0,00	2,00	24,50	21	31	0,37	0,32	0,50
12 - 8 - 41	77	1,57	2,14	4,57	0,00	0,57	0,29	2,43	1,57	12,29	25,43			0,33		

mais é do que uma tênue película, começa a movimentar-se o adulto, até que a película se rompa na parte ântero-tergal. Depois, por meio das patas, a exúvia ninfal vai sendo empurrada para trás, até ser totalmente despida.

EVOLUÇÃO COMPLETA

Pela soma da duração média dos estádios, obtem-se a duração total do desenvolvimento da Broca, que é de 27,5 dias, com a temperatura média de 24,5°C.

Com o intuito de eliminar qualquer descontinuidade no desenvolvimento, foi estudada a evolução média de cerca de 500 proles. As fêmeas destinadas a gerar essas proles foram isoladas em tubos de vidro, uma em cada um, juntamente com um fruto verdoengo. Todos os tubos foram fechados com algodão e mantidos em cubas de vidro. Foram organizadas 3 séries: os indivíduos da 1.ª série evoluiram em meio ambiente e os da 2.ª e 3.ª em estufa a 22 e 27°C. respectivamente.

Os exames para as 3 séries tiveram início um dia depois de começada a postura. Em cada exame foram abertos de 5 a 10 frutos

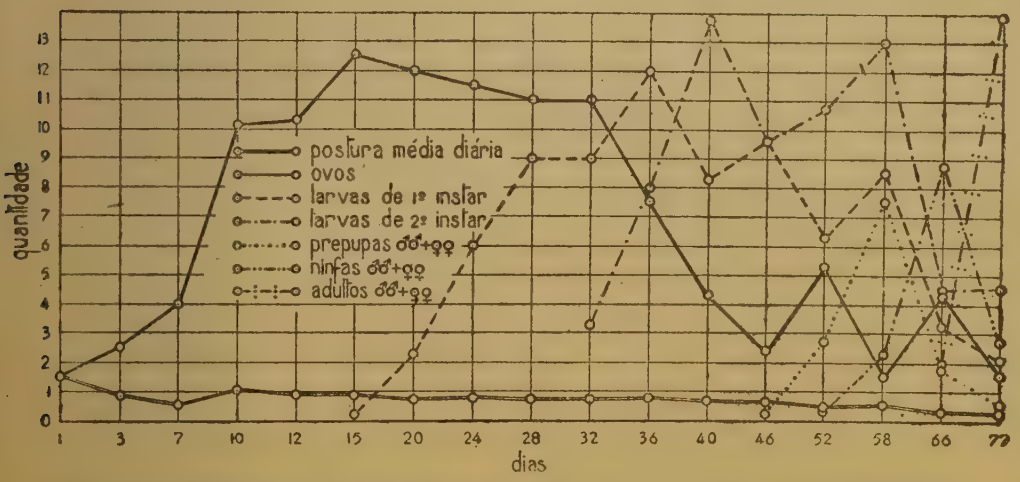


Fig. 3 — Evolução dos estádios, a partir da postura, de um lote de fêmeas que agiram isoladamente. — Temperatura média 19°2 C. (Tabela 8).

e anotada a população existente em cada um. Os dados das tabelas 8, 9 e 10 representam a média dessas contagens. Da tabela 10 podem ser tiradas estas conclusões: a população média por fruto cresceu com regularidade até o 21.° dia; a postura média por fêmea foi regular até o 21.° dia; a postura declinou a partir do 21.° dia, quando apareceram os primeiros adultos; a postura média-diária por fêmea foi, nos primeiros 21 dias, de 2,3 ovos. As novas fêmeas iniciaram as posturas no 29.° dia, isto é, 8 dias depois de nascidas. Também

Tabela 9 — 2.ª Série

Resultados das contagens procedidas em frutos a amadurecer, isolados em tubos, infestados artificialmente e conservados em câmara úmida, em estufa, a 22°C. Data da infestação: 29-5-41. Início da postura: 2-6-41

Data do exame	Dias de postura	Desenvolvimento da população média por fruto									Postura por fêmea					
		Ovos	Larvas		Prepupas		Ninfas		Adultos		Total			Diária		
			1.º instar	2.º instar	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	méd.	mín.	máx.	méd.	mín.	máx.
2-6-41	1	1,90									1,9	1	2	1,9	1,00	2,00
5-6-41	3	6,40									6,4	5	10	2,1	1,66	3,33
7-6-41	5	13,50									13,5	11	15	2,7	2,20	3,00
9-6-41	7	13,80	0,50								14,3	9	19	2,0	1,29	2,71
11-6-41	9	15,90	2,70								18,6	12	29	2,1	1,33	3,22
14-6-41	12	16,80	10,30	0,33							27,5	23	32	2,3	1,75	2,66
18-6-41	16	14,60	13,70	2,30							30,6	23	36	1,9	1,44	2,25
22-6-41	20	6,80	13,10	6,50	0,33	1,00	0,33	0,17			31,3	25	38	1,6	1,25	1,90
26-6-41	24	4,40	17,00	5,20	0,60	2,20	0,20	1,40			31,0	26	40	1,3	1,08	1,66
30-6-41	28	4,00	10,00	14,00	0,60	1,80	0,80	4,00			35,2	19	55	1,3	0,68	1,96
4-7-41	32	4,00	3,75	12,00	0,00	2,50	1,25	7,00	0,50	1,50	32,5	26	37	1,0	0,81	1,16
8-7-41	36	0,25	3,75	8,25	0,00	1,00	1,75	8,50	2,75	6,00	32,25	26	43	0,9	0,72	1,19

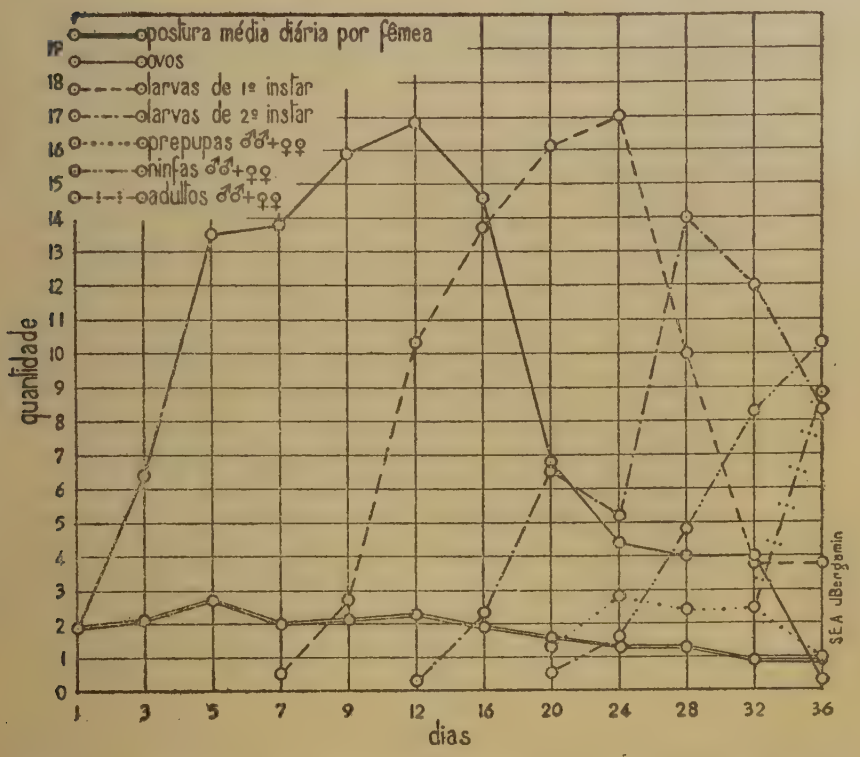


Fig. 4 — Evolução dos estádios a partir da postura, de um lote de fêmeas que agiram isoladamente, em estufa. Temperatura constante: 22° C. (Tabela 9)

pela tabela 9 pode-se verificar que a população cresceu regularmente até o aparecimento dos primeiros adultos, o mesmo se dando com as fêmeas constantes da tabela 8. Estas puseram de maneira mais irregular, provavelmente por causa das variações de temperatura. As temperaturas baixas dilatam enormemente os períodos de desenvolvimento e exercem certa ação prejudicial à atividade ovipositora do inseto.

Em outro estudo foi acompanhado o desenvolvimento completo de 80 indivíduos, desde a postura até a emergência dos adultos.

Para a observação acima foram aproveitadas larvas que, logo após o nascimento, foram colocadas em galerias abertas artificialmente à razão de uma por semente. A evolução foi acompanhada diariamente, pelo levantamento de pequena calota da semente, que fechava a galeria. À medida que a larva penetrava, fazia-se necessário ir cortando finas lâminas da semente, até que a larva pudesse ser vista ao binocular.

À medida que apareceram, as prepupas foram retiradas e grupadas pela idade, em placas separadas.

Tabela 10 — 3.ª Série

Resultados das contagens procedidas em frutos a amadurecer, isolados em tubos, infestados artificialmente e conservados em câmara úmida, em estufa a 27°C. Data da infestação: 4-7-41. Início da postura: 6-7-41

Data do exame	Dias de postura	Desenvolvimento da população média por fruto									Postura por fêmea					
		Ovos	Larvas		Prepupas		Ninfas		Adultos		Total			Média diária		
			1.º instar	2.º instar	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	méd.	mín.	máx.	méd.	mín.	máx.
7-7-41	1	1,50									1,5	0,0	3,0	1,50	0,00	3,00
9-7-41	3	6,00									6,0	4,0	8,0	2,00	1,33	2,66
11-7-41	5	13,00	0,40								13,4	10,0	15,0	2,68	2,00	3,00
13-7-41	7	15,20	2,80								18,0	12,0	24,0	2,57	1,71	3,43
15-7-41	9	14,60	7,60								22,2	16,0	30,0	2,46	1,78	3,33
17-7-41	11	13,50	16,25	3,25							33,0	31,0	35,0	3,00	2,80	3,18
19-7-41	13	13,80	11,20	7,00							32,0	20,0	40,0	2,46	1,54	3,08
21-7-41	15	9,60	13,20	11,60	0,20	0,40					35,0	28,0	39,0	2,33	1,87	2,60
23-7-41	17	9,50	14,84	11,50	0,17	1,67	0,00	1,00			38,7	28,0	49,0	2,27	1,64	2,88
25-7-41	19	7,30	12,33	16,50	0,50	2,83	0,33	2,83			42,7	25,0	63,0	2,24	1,32	3,33
27-7-41	21	5,20	8,80	11,00	0,20	5,20	1,00	11,40	0,20	2,40	45,4	32,0	60,0	2,16	1,52	2,86
29-7-41	23	2,50	11,16	11,00	0,00	2,00	1,16	8,33	0,66	6,66	43,5	38,0	50,0	1,89	1,74	2,10
31-7-41	25	3,50	6,50	13,50	0,25	1,00	0,50	10,75	1,00	8,75	45,7	29,0	59,0	1,83	1,16	2,40
2-8-41	27	0,66	2,66	10,33	0,33	2,00	0,33	8,00	0,33	16,66	41,3	36,0	45,0	1,53	1,33	1,66
4-8-41	29	5,66	5,66	4,00	0,33	2,66	0,00	7,00	2,00	19,00	46,3	36,0	59,0	1,59	1,24	2,00
6-8-41	31	7,66	1,66	2,66	0,00	0,66	1,00	6,66	2,33	22,33	45,0	32,0	67,0	1,45	1,03	2,16
8-8-41	33	15,00	0,00	2,50	0,00	0,25	0,00	0,75	2,25	23,25	44,0	28,0	63,0	1,33	0,85	1,90
10-8-41	35	23,33	2,66	0,66	0,00	0,00	0,00	0,66	2,00	18,66	48,0	40,0	55,0	1,37	1,14	1,57
12-8-41	37	24,00	1,20	1,00	0,00	0,00	0,00	1,20	2,33	24,83	54,5	37,0	80,0	1,47	1,00	2,16

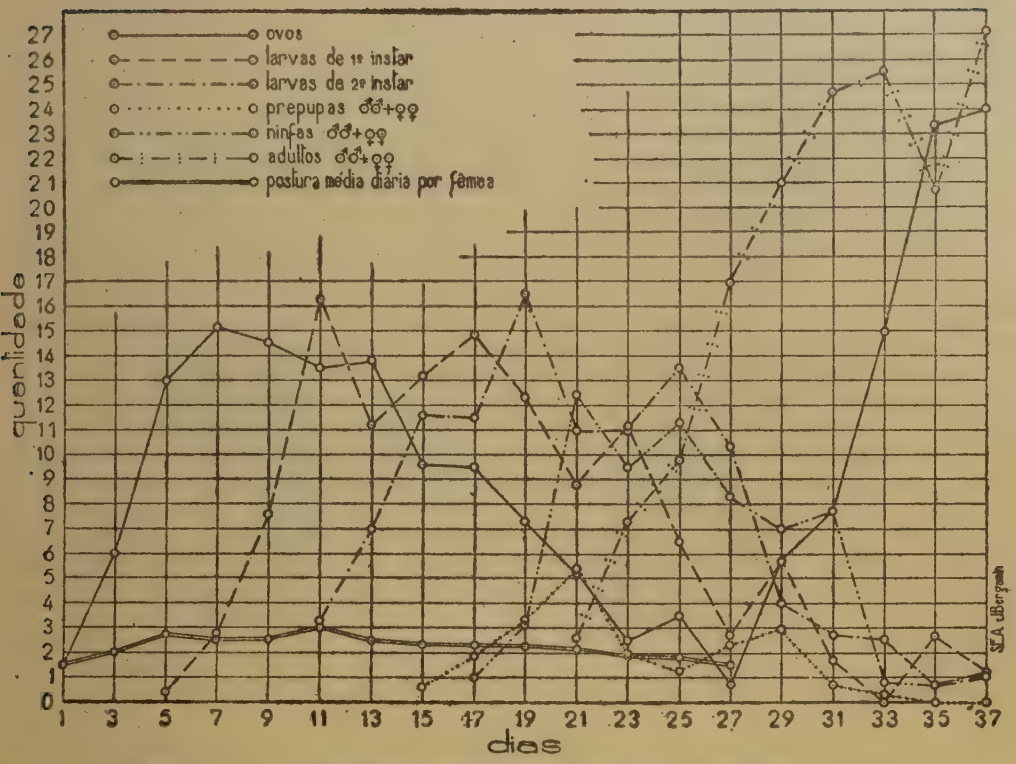


Fig. 5 — Evolução dos estádios, a partir da postura, de um lote de fêmeas que agiram isoladamente, em estufa. Temperatura constante: 27° C. (Tabela 10)

Posteriormente foram retiradas, todos os dias, as ninfas encontradas. Estas foram também grupadas e passadas para outras placas, até a emergência dos adultos.

A tabela 12 revela o desenvolvimento dos 80 indivíduos acima referidos.

Tabela 11

Desenvolvimento médio de um ciclo, a diferentes temperaturas (Resumo das tabelas 8, 9 e 10)

Temperatura / Períodos	19,2°C.	22°C.	27°C.
Incubação	13,5	6	4
Larva	29,5	14	11
Prepupa	6	4	2
Ninfa	14	8	4
Evolução total em dias .	63	32	21

Tabela 12

Desenvolvimento completo de 80 indivíduos, observados separadamente, um em cada semente

Datas				Duração dos estádios em dias			Ciclo total		Temp. em t°C.
Postura	Eclosão	Ninfa	Adulto	Ovo	Larva	Ninfa	Dias	N.° de indivíduos	
30-7-40	5-8-40	23-8-40	1-9-40	6	18	9	33	6	21,9
30-7-40	6-8-40	24-8-40	1-9-40	7	18	8	33	3	21,9
31-7-40	11-8-40	24-8-40	1-9-40	11	13	8	32	3	21,9
31-7-40	7-8-40	25-8-40	2-9-40	7	18	8	33	8	22,0
31-7-40	9-8-40	25-8-40	2-9-40	9	16	8	33	12	22,0
1-8-40	8-8-40	27-8-40	2-9-40	7	19	6	32	15 (2 ♂♂)	22,0
1-8-40	10-8-40	27-8-40	2-9-40	9	17	6	32	1	22,0
4-8-40	15-8-40	29-8-40	6-9-40	11	14	8	33	5	22,0
5-8-40	15-8-40	29-8-40	6-9-40	10	14	8	32	9	22,1
8-8-40	19-8-40	2-9-40	11-9-40	11	14	9	34	3	22,4
12-8-40	21-8-40	4-9-40	11-9-40	9	14	7	30	1	22,0
12-8-40	22-8-40	4-9-40	11-9-40	10	13	7	30	9 (3 ♂♂)	22,0
13-8-40	22-8-40	4-9-40	13-9-40	9	13	9	31	2	22,5
13-8-40	22-8-40	4-9-40	11-9-40	9	13	7	29	3 (2 ♂♂)	22,8
Médias				8,6	15,9	7,6	32,1	80	22,2

As observações feitas em Java por LEEFMANS, quanto à evolução, em dias, do ovo à emergência do adulto: mínima 20; média 25 e máxima 36. De OLIVEIRA FILHO: mínima 34 e máxima 61. GOWDEY, citado por ROEPKE, dá para a África central os seguintes períodos para a evolução do *Hypothenemus:* incubação, 8 a 12 dias; larva, 21 a 28 dias (3 a 4 semanas); ninfose, 15 a 18 dias. Evolução completa, 1,5 a 2 meses. VEUILLET (também em ROEPKE) dá os mesmos períodos.

LONGEVIDADE E ALGUNS HÁBITOS DOS MACHOS

A função única do macho é copular com determinado número de fêmeas. Para isso, considerados os hábitos da Broca, não necessita ausentar-se do fruto em que nasceu, pois aí estão, ao seu lado, as fêmeas virgens aguardando a cópula. Pela desnecessidade de usá-las é que o macho nasce sem asas membranosas.

Não obstante precisar de pouco alimento, abre o macho galeria, quando colocado só, ao lado de um fruto. Essa galeria tem um diâmetro muito menor do que a aberta pelas fêmeas.

Longevidade — O macho não vive muito. Depois de haver copulado com certo número de fêmeas, dez ou doze, às vezes mais, está no fim da vida. Normalmente não dura mais de 40 dias.

Temos a longevidade de três machos que permaneceram, cada qual com uma fêmea em frutos onde observávamos a longevidade e a

fecundidade delas. Os três nasceram em 25-5-41. Em 29/5 colocámos cada macho com uma fêmea. Acompanhámos, depois, em exames sucessivos, a vida das três fêmeas, que faziam parte de um lote de 20 outras, em observação quanto à fecundidade e longevidade. Em cada exame, tomámos as necessárias precauções para não os perder de vista. Conseguimos, dessa forma, seguir-lhes a vida e saber que êles viveram: o primeiro até 11/8/41, o segundo até 13/8/41 e o terceiro até 5/9/41, ou sejam 78, 80 e 103 dias, respectivamente.

POSTURA TOTAL E LONGEVIDADE DAS FÊMEAS

A fecundidade da Broca do Café foi calculada por contagens periódicas dos descendentes de 54 fêmeas nascidas em laboratório e

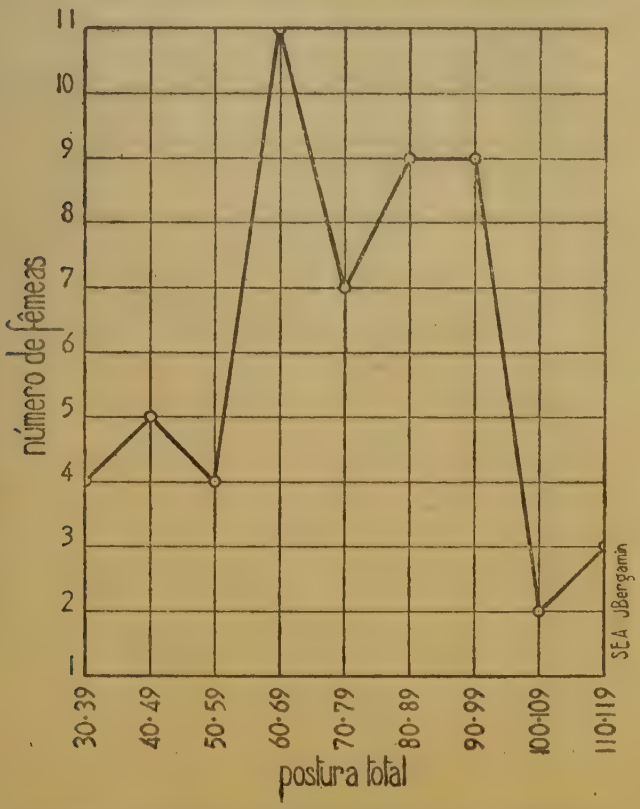


Fig. 6 — Postura total de 54 fêmeas (Tabela 13).

colocadas, cada uma em um fruto verdoengo, em 54 caixas de Petri de 40 mm de diâmetro. Paralelamente a êsse estudo foi verificada a longevidade dessas fêmeas, a cuja reprodução foi dado ambiente favoravel.

Um fruto em início de maturação conserva suas propriedades pelo espaço de 40 ou 50 dias, quando colocado em ambiente saturado

TABELA

Postura total e longevidade de 54 fêmeas, submetidas a temperatura ambiente — calculada sôbre

Fêmeas	Nascimento	Morte	Em dias		Conta					
					1.ª		2.ª		3.ª	
			Longevidade	Período ativo	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos
1	24-1-41	3- 6-41	130	80	10-2-41	16	26-2-41	0	6-3-41	11
2	" " "	4- 5-41	100	80	" " "	15	" " "	0	" " "	5
3	" " "	5- 5-41	101	68	" " "	25	" " "	5	" " "	18
4	" " "	3- 5-41	99	80	" " "	15	" " "	11	" " "	8
5	" " "	5- 5-41	101	80	" " "	35	" " "	11	" " "	12
6	" " "	4- 6-41	131	117	" " "	22	" " "	11	14-3-41	13
7	" " "	1- 6-41	128	101	" " "	14	" " "	12	" " "	13
8	" " "	5- 5-41	101	90	" " "	19	" " "	6	" " "	13
9	" " "	9- 6-41	136	117	" " "	9	" " "	14	" " "	15
1 10	7-2-41	23- 6-41	136	103	23-2-41	0	7-3-41	2	" " "	0
11	" " "	4- 7-41	147	103	" " "	13	" " "	1	" " "	13
12	" " "	8- 7-41	151	87	" " "	23	" " "	* 0	" " "	10
13	" " "	19- 7-41	162	147	" " "	18	8-3-41	14	" " "	11
14	" " "	23- 6-41	136	69	" " "	13	12-3-41	15	20-3-41	9
15	" " "	21- 5-41	103	87	" " "	17	" " "	17	" " "	8
16	" " "	20- 5-41	102	69	" " "	10	" " "	7	" " "	0
17	" " "	18- 5-41	100	87	" " "	19	" " "	17	" " "	13
18	" " "	30- 8-41	204	87	" " "	15	" " "	15	" " "	11
19	24-2-41	" " "	187	130	24-3-41	12	8-4-41	25	17-4-41	11
20	" " "	17- 7-41	143	105	" " "	10	" " "	21	" " "	12
2 21	" " "	3- 6-41	99	86	" " "	0	" " "	37	" " "	* 0
22	" " "	13- 7-41	139	75	" " "	17	" " "	28	" " "	9
23	" " "	4- 7-41	130	75	" " "	9	" " "	5	" " "	21
24	" " "	16- 7-41	142	130	" " "	14	" " "	10	" " "	18
25	" " "	1- 8-41	158	130	" " "	18	" " "	20	" " "	19
26	20-3-41	9- 6-41	81	62	14-4-41	26	28-4-41	29	21-5-41	33
27	" " "	3- 9-41	167	138	" " "	* 0	" " "	23	" " "	28
28	" " "	28- 7-41	130	106	" " "	23	" " "	7	" " "	31
29	" " "	23- 6-41	95	62	" " "	25	" " "	28	" " "	31
30	" " "	28- 7-41	130	106	" " "	26	" " "	13	" " "	14
31	" " "	5- 8-41	138	106	" " "	24	" " "	21	" " "	29
32	26-3-41	5- 9-41	163	161	18-4-41	4	" " "	20	16-5-41	15
33	" " "	8-10-41	196	161	" " "	4	" " "	22	" " "	26
34	29-3-41	" " "	193	129	30-4-41	20	13-5-41	10	3-6-41	9
35	" " "	25- 9-41	180	129	" " "	20	" " "	6	" " "	17
36	" " "	4-12-41	250	101	" " "	18	" " "	6	" " "	0
37	" " "	3- 9-41	158	129	" " "	18	" " "	11	" " "	10
38	" " "	5- 1-42	282	262	" " "	19	" " "	17	" " "	28
39	" " "	18-11-41	234	221	" " "	20	" " "	12	" " "	23
40	" " "	4-11-41	220	180	" " "	19	" " "	12	" " "	10
41	" " "	6-10-41	191	158	" " "	19	" " "	16	" " "	12
42	" " "	30- 9-41	185	158	" " "	16	" " "	19	" " "	15
43	4-5-41	29-11-41	209	200	26-5-41	29	25-6-41	25	11-8-41	8
44	" " "	6-10-41	155	121	" " "	15	" " "	20	" " "	9
45	" " "	30- 9-41	149	121	" " "	32	" " "	22	" " "	0
46	" " "	23- 9-41	142	121	" " "	20	" " "	27	" " "	11
47	" " "	27- 9-41	146	121	" " "	31	" " "	22	" " "	11
48	" " "	13-10-41	162	121	" " "	16	" " "	1	" " "	10
49	" " "	4-11-41	184	150	" " "	27	" " "	20	" " "	16
50	" " "	20-11-41	200	185	" " "	21	" " "	8	" " "	3
51	" " "	29-10-41	178	121	" " "	28	" " "	14	" " "	4
52	" " "	28-12-41	238	121	" " "	12	" " "	15	" " "	0
3 53	" " "	18-11-41	198	121	" " "	0	" " "	2	" " "	7
4 54	" " "	29-10-41	178	121	" " "	0	" " "	19	" " "	5

1 — ♀ virgem — ♂ em 25-2.
2 — " " — " " 27-3.
3 e 4 — ♀♀ virgens ♂♂ em 29-5.
* fruto chocho
+ morte

13

Longevidade média: 156,6 dias; postura total média: 74,1 ovos; postura diária média, longevidade: 0,47 ovo

gens

4.ª		5.ª		6.ª		7.ª		8.ª	
Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos
14-3-41	18	24- 3-41	15	2- 4-41	0	14- 4-41	5	24- 4-41	0
" " "	15	" " "	9	" " "	4	" " "	9	" " "	0
" " "	10	" " "	15	" " "	2	" " "	* 0	" " "	0
" " "	11	" " "	0	" " "	5	" " "	14	" " "	0
" " "	13	" " "	8	" " "	0	" " "	7	" " "	0
24-3-41	13	2- 4-41	9	14- 4-41	9	24- 4-41	0	5- 5-41	3
" " "	15	" " "	10	" " "	9	" " "	11	" " "	9
" " "	16	" " "	9	" " "	8	" " "	4	" " "	+ 0
" " "	20	" " "	16	" " "	17	" " "	11	" " "	1
" " "	2	" " "	1	" " "	13	" " "	15	" " "	9
" " "	15	" " "	9	" " "	13	" " "	11	" " "	10
" " "	23	" " "	13	" " "	20	" " "	16	" " "	5
" " "	17	" " "	7	" " "	17	" " "	9	" " "	12
28-3-41	11	8- 4-41	14	17- 4-41	9	" " "	0	" " "	0
" " "	10	" " "	16	" " "	9	" " "	5	" " "	5
" " "	8	" " "	7	" " "	5	" " "	0	" " "	0
" " "	10	" " "	17	" " "	12	" " "	7	" " "	11
" " "	10	" " "	3	" " "	10	" " "	0	" " "	7
28-4-41	16	10- 5-41	7	21- 5-41	7	9- 6-41	4	4- 7-41	5
" " "	* 0	" " "	6	" " "	11	" " "	3	" " "	0
" " "	20	" " "	10	" " "	3	3- 6-41	+ 0		
" " "	* 0	" " "	14	" " "	* 0	9- 6-41	0	" " "	0
" " "	0	" " "	10	" " "	0	" " "	0	" " "	+ 0
" " "	2	" " "	16	" " "	9	" " "	0	" " "	4
" " "	12	" " "	0	" " "	17	" " "	7	" " "	5
9-6-41	+ 0								
" " "	0	4- 7-41	17	5- 8-41	17	3- 9-41	+ 0		
" " "	8	" " "	11	28- 7-41	+ 0				
" " "	0	23- 6-41	+ 0						
" " "	4	4- 7-41	8	28- 7-41	+ 0				
" " "	8	" " "	9	5- 8-41	+ 0				
10-6-41	5	21- 7-41	1	3- 9-41	17	15- 9-41	+ 0		
" " "	19	" " "	7	" " "	18	" " "	0	8-10-41	+ 0
8-7-41	17	5- 8-41	5	" " "	0	2-10-41	0	" " "	+ 0
" " "	15	" " "	3	" " "	0	25- 9-41	+ 0		
" " "	15	" " "	0	" " "	0	" " "	0	5-11-41	0
" " "	0	" " "	9	" " "	+ 0				
" " "	16	" " "	6	" " "	14	" " "	5	" " "	9
" " "	11	" " "	7	" " "	20	" " "	0	" " "	2
" " "	11	" " "	8	" " "	11	" " "	3	4-11-41	+ 0
" " "	9	" " "	0	" " "	3	" " "	0	6-10-41	+ 0
" " "	7	" " "	7	" " "	17	30- 9-41	+ 0		
2-9-41	19	1-10-41	0	5-11-41	9	29-11-41	+ 3		
" " "	3	" " "	0	6-10-41	+ 0				
" " "	12	30- 9-41	+ 0						
" " "	30	23- 9-41	+ 0						
" " "	28	27- 9-41	+ 0						
" " "	17	1-10-41	0	13-10-41	+ 0				
" " "	3	" " "	2	4-11-41	+ 0				
" " "	17	" " "	8	5-11-41	3	20-11-41	+ 0		
" " "	12	" " "	0	29-10-41	+ 0				
" " "	6	" " "	0	5-11-41	0	16-12-41	0	28-12-41	+ 0
" " "	18	" " "	0	" " "	4	18-11-41	+ 0		
" " "	17	" " "	0	29-10-41	+ 0				

(continúa)

Tabela 13 (Continuação)

Postura total e longevidade de 54 fêmeas, submetidas a temperatura ambiente — Longevidade média: 156,6 dias; postura total média: 74,1 ovos; postura diária média, calculada sôbre longevidade: 0,47 ovo

Fêmeas	Contagens								N.º de ovos		Temperat. em t°C.
	9.ª		10.ª		11.ª		12.ª				
	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Data	N.º de ovos	Total	Médio Diário	
1	5- 5-41	0	21-5-41	0	3-6-41	+ 0			65	0,50	23,0
2	4- 5-41	+ 0							57	0,57	25,1
3	5- 5-41	+ 0							75	0,74	25,0
4	3- 5-41	+ 0							64	0,65	25,2
5	5- 5-41	+ 0							86	0,85	25,0
6	21- 5-41	10	4-6-41	+ 0					90	0,69	23,1
7	" " "	0	1-6-41	+ 0					93	0,73	22,8
8									75	0,74	25,0
9	" " "	3	9-6-41	+ 0					106	0,78	23,3
10	" " "	8	" " "	0	23-6-41	+ 0			50	0,37	22,6
11	" " "	8	" " "	0	4-7-41	+ 0			93	0,63	21,6
12	" " "	0	" " "	0	" " "	0	8-7-41	+ 0	110	0,73	21,6
13	" " "	10	" " "	3	" " "	1	19-7-41	+ 0	119	0,73	21,6
14	" " "	0	" " "	0	23-6-41	+ 0			71	0,53	22,6
15	" " "	+ 0							87	0,84	23,8
16	20- 5-41	+ 0							37	0,36	23,8
17	18- 5-41	+ 0							106	1,06	23,9
18	21- 5-41	0	9-6-41	0	4-7-41	0	7-7-41	+ 0	71	0,35	21,8
19	5- 8-41	0	30-8-41	+ 0					87	0,46	21,5
20	17- 7-41	+ 0							63	0,44	21,3
21									70	0,71	21,7
22	18- 7-41	+ 0							68	0,49	21,3
23									45	0,35	21,3
24	16- 7-41	+ 0							73	0,51	21,3
25	1- 8-41	+ 0							98	0,62	21,5
26									88	1.08	21,5
27									85	0,51	21,2
28									80	0,61	20,8
29									84	0,88	21,8
30									65	0,50	20,8
31									91	0.66	21,1
32									62	0,38	20,8
33									96	0,49	20,8
34									61	0,32	20,8
35									61	0,32	20,6
36	4-12-41	+ 0							39	0,16	21,0
37									48	0,30	21,2
38	16-12-41	3	5-1-42	+ 0					117	0,41	21,6
39	18-11-41	+ 0							95	0,40	21,0
40									74	0,37	21,1
41									59	0,31	20,7
42									81	0,44	20,6
43									93	0,44	21,2
44									47	0,30	20,8
45									66	0,44	20,7
46									88	0,62	20,6
47									92	0,63	20,7
48									44	0,27	20,8
49									68	0,37	21,3
50									60	0,30	21,2
51									58	0,32	20,8
52									33	0,13	21,5
53									31	0,16	21,2
54									41	0,23	20,8

de umidade. Mesmo perfurado pela Broca, êle não se altera, e isso tornou possível dar às fêmeas um ambiente no qual pudessem atingir o máximo de postura e de longevidade.

Em cada contagem foram registrados os descendentes da fêmea de cada placa. As contagens ou exames não foram feitos com intervalos certos. No verão, como o desenvolvimento das proles fôsse mais rápido, os intervalos entre as contagens foram mais curtos. Procurou-se,

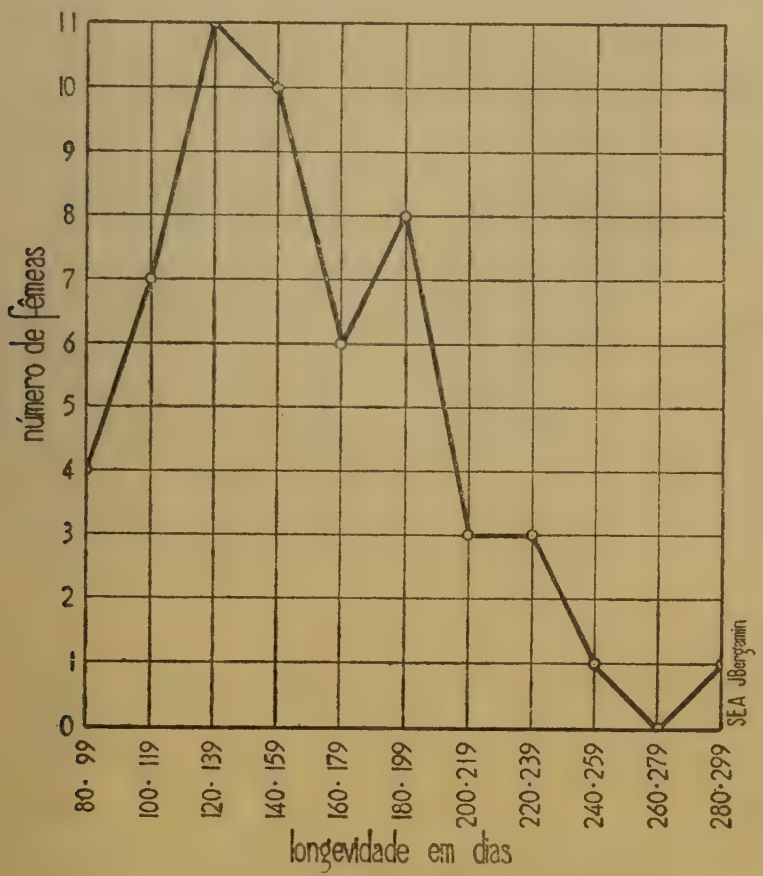


Fig. 7 — Longevidade, em dias, de 54 fêmeas. (Tabela 13)

com isso, evitar a evolução completa dos indivíduos, para afastar a possibilidade de confusão entre a fêmea em observação e seus descendentes adultos, si êstes aparecessem no interior do mesmo fruto.

Foram organizados vários lotes, de Janeiro a Maio de 1941, para a verificação da influência da mais alta ou mais baixa temperatura na oviposição e na longevidade das fêmeas.

Em cada contagem foi dado novo fruto, também verdoengo, a cada fêmea.

Foi observado que a fêmea morre fora do fruto ou no interior de uma galeria muito curta, o que permitiu que se soubesse o dia certo de sua morte. Uma, apenas, foi encontrada morta no interior do fruto, ao lado de alguns ovos (n.º 43 da tabela 13).

A tabela 13 revela, com os detalhes empregados na observação, como foram conseguidos os resultados desta parte.

Tabela 14

Postura total e longevidade das fêmeas da tabela 13

	Média	Mínima	Máxima
Postura total	74,1	31	119
Longevidade em dias . . .	156,6	81	282

Os dados acima revelados discordam enormemente dos encontrados em LEEFMANS, OLIVEIRA FILHO, ROEPKE, etc. As condições diferentes para as observações foram, com certeza, a causa dessa discrepância. LEEFMANS encontrou para fecundidade máxima, em todas as suas observações, 56 ovos, e para duração máxima de vida, 102 dias. OLIVEIRA FILHO encontrou 33 para o maior número de ovos postos por uma fêmea, e 118 dias como longevidade máxima.

GERAÇÕES ANUAIS

De uma criação artificial iniciada em 24-2-41, foram retiradas cerca de 48 fêmeas, para o início de um estudo de gerações. Foram elas isoladas cada uma com uma semente já bem despolpada. 48 horas após a completa penetração de todas as fêmeas, cada uma das sementes foi colocada em placa de 60 mm de diâmetro com mais 10 sementes sãs. Todas as placas foram conservadas em câmara úmida. Cerca de 6 a 8 dias depois de nascidas, as primeiras fêmeas abandonaram o fruto em que se criaram. Apenas as primeiras fêmeas saídas espontaneamente foram aproveitadas; e deu-se aquí o nome de t e m p o d e u m a g e r a ç ã o ao número de dias decorridos entre a saída das primeiras fêmeas de uma geração e a saída das primeiras fêmeas da geração seguinte.

Por êsse processo foi possível observar que, havendo sementes sãs, nas placas, as fêmeas nelas penetraram no mesmo dia em que abandonaram a semente em que evoluiram. Cada nova semente perfurada foi então isolada em outra placa, juntamente com 10 outras sementes sãs.

Ao cabo de um ano teve início a 8.ª geração, o que indica que, em 12 meses, foram obtidas 7 gerações completas. Na tabela 15 damos a sua distribuição.

Tabela 15

Gerações anuais

Gerações		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª	8.ª
Início		4-4-41	23-5-41	25-8-41	5-11-41	22-12-41	24-1-42	24-2-42	27-3-42
Duração em dias		49	94	72	47	33	31	31	
Temperaturas	Média	23,5	20,0	21,7	23,4	24,1	25,3	25,1	
	Mínima	16,0	11,0	9,0	16,3	20,0	21,0	21,0	
	Máxima	30,6	27,6	32,0	32,0	31,5	30,2	32,0	

Na natureza as primeiras gerações se desenvolvem mais rapidamente. Seguindo a evolução de laboratório, conclue-se que, no campo, de Dezembro-Janeiro (época em que a Broca inicia, em frutos novos, as primeiras infestações), a fim de Maio (época da colheita), 4 gerações se completam. Como a colheita não é executada em poucos dias, pode-se admitir que na lavoura se completam, anualmente, 5 gerações. Se se considerar um ano muito chuvoso, em que não percam os frutos remanescentes da colheita a umidade necessária à reprodução da Broca, pode-se admitir que, embora com menor volume de população, haverá 7 gerações. Havendo condições favoraveis, não haverá interrupção de ciclos. E essas condições existem, normalmente, nas lavouras, melhores uns anos, menos favoráveis outros: nos frutos por qualquer motivo deixados sôbre o solo, à sombra dos cafeeiros, sob a proteção constante da "saia". Também nesses frutos há evolução, e só neles ela é possível em ano de sêca intensa. Sua destruição corresponde à interrupção dos ciclos, além do extermínio de avultada quantidade de adultos.

PARTENOGÊNESE

Não obstante estar provado que a Broca não se reproduz por partenogênese, aproveitámos os ovos de uma série de 11 fêmeas virgens, sob observação para o estudo da longevidade, para a mesma pesquisa já feita por LEEFMANS.

Normalmente a fêmea virgem não põe. Sob condições muito favoráveis de temperatura e de umidade, contudo, não é dificil conseguir-se postura, sendo o número de ovos quasi sempre pequeno.

TABELA 16

Longevidade e postura total de 11 fêmeas virgens

Longevidade média 195 dias; postura total média 40,7; temperatura média 20,4°C.

	Nascimento	Morte	Dias	Contagens																N.° total de ovos	Temperatura média
				1.ª		2.ª		3.ª		4.ª		5.ª		6.ª		7.ª		8.ª			
			Longevidade	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos	Data	N.° de ovos		
1	26-3-41	30- 8-41	157	15-4-41	3	28-4-41	13	16-5-41	12	10-6-41	0	21-7-41	0	30-8-41	+					28	20,9
2	" " "	2-10-41	190	" " "	7	" " "	14	" " "	7	" " "	5	" " "	0	3-9-41	0	2-10-41	+			33	19,6
3	" " "	29-10-41	217	" " "	10	" " "	19	" " "	0	" " "	10	" " "	0	" " "	0	" " "	0	29-10-41	+	39	20,6
4	" " "	2-10-41	190	" " "	5	" " "	16	" " "	9	" " "	0	" " "	0	" " "	2	" " "	+			32	19,6
5	" " "	11-10-41	199	" " "	12	" " "	7	" " "	13	" " "	7	" " "	3	" " "	0	" " "	0	11-10-41	+	42	20,6
6	" " "	10- 9-41	168	" " "	10	" " "	16	" " "	10	" " "	5	" " "	0	" " "	0	10- 9-41	+			41	20,4
7	" " "	6- 9-41	164	" " "	10	" " "	15	" " "	18	" " "	2	" " "	2	" " "	0	6- 9-41	+			47	20,5
8	" " "	6-11-41	225	" " "	9	" " "	17	" " "	14	" " "	0	" " "	0	" " "	0	2-10-41	0	6-11-41	+	40	21,0
9	" " "	10-10-41	198	" " "	10	" " "	17	" " "	14	" " "	3	" " "	5	" " "	9	" " "	0	10-10-41	+	58	20,4
10	" " "	8-11-41	227	" " "	7	" " "	27	" " "	7	" " "	3	" " "	6	" " "	11	" " "	0	8-11-41	+	61	21,0
11	" " "	29-10-41	217	" " "	6	" " "	7	" " "	5	" " "	3	" " "	0	" " "	0	" " "	0	29-10-41	+	21	20,6

+ Morte

A longevidade média das fêmeas virgens é maior do que a das fecundas. Em várias investigações separámos 11 fêmeas virgens, oriundas de ninfas anteriormente isoladas. Colocadas, cada uma em uma caixa de Petri de 40 mm de diâmetro, verificámos que todas perfuraram e fizeram posturas no fruto verdoengo também colocado em cada caixa.

Todos os ovos postos por essas fêmeas virgens foram colocados em ambiente favoravel à incubação. Permaneceram muitos dêles até 35 dias depois de postos, sem que fôsse notada qualquer transformação em seu aspecto. Nenhuma larva eclodiu de qualquer dos 442 ovos da tabela 16.

Isso prova que a partenogênese não ocorre com a Broca do Café. A suspeita de que ela devia existir, dada a proporção sexual de um macho para dez fêmeas, desaparece, para dar lugar à certeza de que cada macho é capaz de copular, em média, com 10 fêmeas.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE COFFEE BERRY-BORER "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERRARI, 1867)" (COL. IPIDAE)

Abstract

In the present paper the entire development, habit and geographic distribution of the coffee berry-borer H. hampei are discussed.

Adult weevils spend the intervals of coffee groves production in the field, feeding upon fruits of crops remainder. Oviposition and weevil development may therefore continue during the entire year. The females longevity ranged from 81 to 282 days. The average longevity for 54 females was 156.6 days. Male longevity ranged from 78 to 103 days.

The proportion of sexes is one male to 9.75 females.

Mating occurs within the fruit in which brood was reared, generaly four days later after adult stage is reached.

After mating a part of each offspring remains in the same fruit.

In the laboratory the average oviposition period range from 11 to 15 days and the number of eggs per female from 24 to 63 eggs under a constant temperature of 27°C.

The average number of eggs per female recorded for a lot of 54 individuals periodically changed from fruit was 74 eggs; a minimum of 31 and a maximum of 119 having been recorded.

The incubation period ranged from 4 (27°C.) to 16 (18.7°C.) days with an average of 7.6 days (23,1°C.).

Two molts were recorded for female and one to male larvae during their development. Host fruits conditions and temperature are important factors determining rate of larval growth.

The larval period stage ranged from 9 to 20 days with an average of 13.8 days (24.8°C.).

The mature larva forms a cell and enters the prepupal stage which lasts from 2 to 6 days.

The pupal period stage ranged from 4 to 10 days with an average of 6.4 days (25.8°C.).

The average time required for a lot of individuals to complete their entire life cycle from egg to adult ranged from 21 (27°C.) to 63 (19.2°C.) days, with an average of 27.5 days (24.6°C.).

Reproduction by parthenogenesis did not occur although eggs were laid by virgin females.

Seven generations were observed in one year.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, E. NAVARRO DE — 1914 — A cultura do café nas Indias Neerlandezas. *Secr. Agr.*, S. Paulo, VII e 118 pp.

ANDRADE, E. NAVARRO DE, A. NEIVA & A. COSTA LIMA — 1924 — Relatório da Comissão Técnica sôbre a broca do café (S. coffeae Hag.). *Serv. de Defesa do Café.* S. Paulo, Pub. 1. 11 pp.

ANÔNIMO — 1921 — Le maladie des Caféiers due au Stephanoderes coffeae Haged. *Bull. Agr. Congo Belge*, 12: 624-625.

ANÔNIMO — 1926 — Le Scolyte de grain de café. *Bull. Économique de L'Indochine.* Mai: 193.

ARENS, P. (*) — 1921 — [Algumas comunicações sôbre a broca do café]. *Publicaties van het Nederlandsch-Indisch - Landbouw-Syndicaat*, Soerabaya, 13: 314-332.

BALLY, W. (*) — 1922 — Indrukken van een Reis naar der Lampongs en naar West-Java. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds.* Soerabaya, 3: 43-61.

BEILLE, L. — 1925 — Le Stephanoderes sur les Caféiers cultivés à la Côte d'Ivoire. *Rev. de Bot. appliqué et d'Agr. Col.*, 5e Année — Bul. 45: 387-388.

BERNARD, CH. (*) — 1923 — Verslag van een Reis naar Zuid-Sumatra ter bestudeering van den Koffiebessenboeboek. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds.* Soerabaya, 8: 175-189.

BERTHET, J. J. ARTHAUD — 1913 — Caruncho do café. Informação prestada pelo Sr. Dr. Diretor do I. Agronômico a respeito de amostras de café vindas do Congo Belga. *Bol. Agr.*, S. Paulo. 14: 312-313.

BERTHET, J. J. ARTHAUD — 1913 — Praga do cafeeiro no Oriente. *Bol. Agr.*, S. Paulo. 14: 701.

BERTHET, J. J. ARTHAUD — 1925 — O Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo em Campinas e a Broca do Café. Genoud, Edt., Campinas. 54 pp.

BOUTILLY, V. — 1900 — Le caféier de Libéria — Sa Culture et sa manipulation. Augustin Challamel, Edt., Paris. 139 pp.

CORBETT, G. H. — 1933 — Some preliminary observations on the Coffee Berry Borer, Stephanoderes (Cryphalus) hampei Ferr. *Malayan Agric. Jour.*, Kuala Lumpur. 21: 8-22, 1 pl.

CORPORAAL, J. B. (*) — 1921 — De Koffiebesborder op Sumatra's Oostkust en Atjeh. *Meded. v. h. Algemeen Proefstation der A. V. R. O. S.* 12. 20 pp.

EDWALL, G. — 1924 — O scolyto do grão do café (S. coffeae) segundo as monografias de Morstatt e Vayssière. *Bol. Agr.*, S. Paulo. 25: 257-269 e 293-302.

EGGERS, I. H. — 1922 — Kulturschädliche Borkenkäfer des indischen Archipels. *Ent. Ber. Ned. Ent. Vereen*, Amsterdam. 6, 126: 84-88.

EGGERS, I. H. — 1923 — Neue indomalayische Borkenkäfer (Ipidae). *Zool. Meded. R. Mus. Nat. Hist.*, Leyden. 7, 3-4: 129-220.

FLEUTIAUX, E. — 1901 — Un ennemi du café de Kouilou (Congo). *La Nature*, Paris. Juin: 4.

FONSECA, J. PINTO DE & M. AUTUORI — 1932 — Principais pragas do café no Est. de S. Paulo. *Secr. Agr.*, S. Paulo. 87 pp., 40 figs., 8 est.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — De Bestrijding van de Koffiebessenboeboek op de Onderneming Karang Redjo. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 1, 22 pp.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — Verslag van den Entomoloog over het Tijdvak 1/8/921 t/m 31/12/921. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 2: 21-26.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — Korte Samenvatting der Bestrijdingsmaatregelen tegen den Koffiebessenboeboek. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 2: 27-36.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — Voorschrift voor eene Statistiek over de Boeboek Aantasting op de Koffieondernemingen. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 2: 37-42.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — Kleine Mededeelingen omtrent de Koffiebessenboeboek. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 3: 55-61.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1922 — Verslag over een Reis naar Sumatra's Oostkust. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 5: 90-93.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1923 — Verslag van den Entomoloog over het Tijdvak 1 Januari 1922 tot 31 December 1922. *Meded. Koffienbessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 7: 149-153.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1923 — Verdere Mededeelingen voor de schimmel. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 7: 154-159.

FRIEDERICHS, K. (*) — 1923 — Ontsmetting van aangeboorde koffiebessen met kokend water of stoom. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 7: 160-164.

FRIEDERICHS, K. & W. BALLY (*) — 1922 — Résumé van een publicatie over de parasitische schimmels van den Bessenboeboek. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 5: 78-80.

FRIEDERICHS, K. & W. BALLY (*) — 1923 — Over de parasitische schimmels, die den Koffiebessenboeboek dooden. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 6: 103-147, 5 pl.

GANDRUP, J. (*) — 1922 — Over Boeboek in Loewak Koffie. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 3: 53-54.

GANDRUP, J. (*) — 1922 — Over het binnendringen van den bessenboeboek in het Banjoewangische. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 5: 94-96.

GOWDEY, C. C. — 1910 — Insects injurious to coffee. *Rep. Gov. Entomologist for 1909-1910*, Uganda Protectorate, pp. 7-8.

HAAN, H. R. M. DE (*) — 1922 — Proventer Bostrijding der Bessenboeboek volgens de Methode "van Davelaar" in het Ressort Malang. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 4: 63-75.

HAGEDORN, M. — 1910 — Wieder ein neuer Kaffeeschädling. *Entom. Blätter*, Berlim, 6: 1-4.

HAGEDORN, M. — 1913 — Borkenkäfer (Ipidae) welche tropische Nutzpflanzen beschädigen. *Der Tropenpflanzer*, 17: 43, 47, 102-104.

HALAUER, E. R. (*) — 1923 — Verslag van de proven ter bestrijding der Koffiebessenboeboek met de Methode van Davelaar (Smeermethode). *Meded. Proefst. Midden-Java*, Salatiga, 38: 1-41.

HAMBLETON, E. J. — 1932 — Stephanoderes hampei (Ferr.) reported in State of Minas Gerais. *Rev. Entom.*, S. Paulo, 2: 384.

HARGREAVES, H. — 1922 — Annual Report of the Gov. Entom. 1921, *Uganda Dep. Agric. Ann. Report.*, Entebbe, pp. 57-64.

HEMPEL, A. — 1934 — O Combate à Broca do café por meio da Vespa de Uganda. *Bol. Agr. e Vet.*, Belo Horizonte, 6: 551-555 e *O Campo*, 5: 41-44.

HEMPEL, A. — 1934 — A Prorops nasuta Waterston no Brasil. *Arch. Inst. Biologico*, S. Paulo, 5: 197-212, 5 fig., 4 est.

HUCKE, O. — 1925 — Expurgo da sacaria em S. Paulo contra a broca do café. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 14. 11 pp.

IHERING, R. VON — 1924 — O caruncho do café. *Ch. e Quintais*, S. Paulo, 30: 111-114.

LEEFMANS, S. (*) — 1920 — Voorloopige Medeelingen omtrent Koffiebessenboeboek. *Publ. Ned. Indisch Landbouw Synd.*, Soerabaya, 12: 645-663.

LEEFMANS, S. (*) — 1922 — Verspreiding van der Bessenboeboek door den Loewak (Paradoxurus hermaphroditus Pall.). *Algem. Landbouw-Weekblad Ned.-Indie*, Bandoeng, 7, 6:239.

LEEFMANS, S. (*) — 1923 — De Koffiebessenboeboek (Stephanoderes hampei Ferrari = coffeae Hagedorn). I — Levenswijze en oecologie. *Meded. van het Instituut voor Plantenz.* 57, 94 pp.

LEEFMANS, S. (*) — 1924 — De Koffiebessenboeboek. II — Bestrijding. *Meded. van het Instituut voor Plantenz.* Batavia, 62, 99 pp.

LIMA, A. DA COSTA — 1922 — Sôbre o scolyto destruidor dos cafezais. *Ch. e Quintais*, S. Paulo, 26: 34-45.

LIMA, A. DA COSTA — 1924 — Sôbre a broca do café (Stephanoderes coffeae Hag.). *Ch. e Quintais*, S. Paulo, 30: 111-114, 4 figs. e 413-416, 1 fig.

LIMA, A. DA COSTA — 1925 — Sôbre o caruncho do café (S. coffeae Hag.). *Ch. e Quintais*, S. Paulo, 31: 16-19, 141-143 e 226-227.

LIMA, A. DA COSTA — 1928 — Sôbre alguns cryphalineos observados em sementes de cacaoeiros e de cafeeiros. *Supl. das Mem. do Inst. O. Cruz*, Rio de Janeiro, 4: 117-123, 4 figs., 3 est.

LIMA, A. DA COSTA — 1936 — Terceiro catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. *Min. Agr., Esc. Nac. Agr.*, Rio de Janeiro, 460 pp.

LIMA, A. DA COSTA & A. RAVACHE — 1925 — A Broca do café. *Bol. Min. Agric.*, Rio de Janeiro, 14: 39-42.

MAYNÉ, R. — 1914 — Note sur un ennemi du Caféier. *Bull. agr. Congo Belge.* 5: 596-598.

MOREIRA, C. — 1925 — A Broca do Café - S. coffeae Hag. *Bol. Inst. Biol.*, Rio de Janeiro, 3, 26 pp.

MORSTATT, H. (*) — 1912 — Die Schädlinge u. Krankheiten des Kaffeebaumes in Ostafrika. Amani. Beih. zum *Pflanzer*, 2, VIII.

MORSTATT, H. (*) — 1914 — Kaffeekultur, Kaffeeschädlinge und andere schädliche Insekten im Bezirk Bukoba. *Der Planzer*, 10: 133-141.

NEIVA, A., E. NAVARRO DE ANDRADE & A. QUEIROZ TELLES — 1925 — Instruções para o combate à broca do Café. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 3, 11 pp., 7 est., 1 mapa.

NOVAES, J. DE CAMPOS — 1922 — Um broqueador do cafeeiro — Xyleborus coffeicola n. sp. *Bol. Agr.*, S. Paulo, 23, 3-4: 67-70.

OLIVEIRA FILHO, M. L. DE — 1927 — Contribuição para o conhecimento da broca do café Stephanoderes hampei (Ferr. 1867). *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 20, 95 pp. 44 est.

PAMPLONA, A. — 1927 — Divulgação pelo cinema, dos métodos de combate à Broca do café no Estado de S. Paulo. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 19, 104 pp.

PIZA JUNIOR, S. T. — 1928 — Estragos causados pela Broca do Café. *Rev. Soc. Rural*, S. Paulo, 7, 94: 84-85.

PIZA JUNIOR, S. T. — 1928 — Stephanoderes hampei (O caruncho do café). *Secr. Agr.*, S. Paulo, 52 pp. 32 figs.

ROCHA, J. B. DA — 1926 — Ligeiras notas sôbre a indústria do CS^2 no Brasil e do seu emprêgo na luta contra o Stephanoderes hampei (Ferr.). *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 18, 37 figs., 6 est.

RODOVALHO, B. T. — 1925 — O repasse e seus resultados. *Com. Est. e Deb.*, S. Paulo, 9, 32 pp.

ROEPKE, W. (*) — 1909 — Een nieuwe, gevaardreigend insectenplaag voor de Koffiecultuur op Java. *Cultuurgids.* 2 deged. 11, 19: 365.

ROEPKE, W. (*) — 1919 — Gegevens omtrent de Koffiebessenboeboek (S. hampei Ferr. = coffeae Hag.). *Meded. Inst. Plantenziekten*, Buitenzorg, 38: 2-33, 3 est.

RUTGERS, A. A. L. (*) — 1922 — De Koffiebessenboeboek op Sumatra's Oostkust. Voorloopige mededeeling. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, 5: 85-89.

SERRATET, A. — 1922 — Protection des Plantations de Caféiers contre le Scolyte du grain du café (Stephanoderes hampei). Actes et documents officiels. *L'Agr. Col.*, 6: 117-118.

SMALL, W. — 1915 — Ann. Report Gov. Entomologist, Uganda Protectorate. Dept. Agric., Kampala. *Rev. App. Ent.*, Ser. A — 3: 751.

STROHMEYER, H. (*) 1919 — Über Kaffeeschädlinge auf der Insel Java. *Entom. Blätter*, 6: 186-187.

VAN DAVELAAR, L. (*) — 1921 — Bestrijding Koffiebessen Boeboek. *Proefst. Mid. Java*, Salatiga, Circ., 2, 2 pp.

VAN DER WEELE, H. W. (*) — 1910 — Ein neuer Kaffeeschädling, Xyleborus coffeivorus, n. sp. *Bull. Dep. Agr. Ind. Neerl.*, Buitenzorg, 35: 1-6.

VAN DER WEELE, H. W. (*) — 1910 — Xyleborus coffeivorus, n. sp. een nieuwe Koffieparasiet. *Teysmannia*, Batavia, 21: 308-316.

VAN HALL, C. J. J. (*) — 1919 — Voordracht over de koffiebessenboeboek gehouden te Malang. *Alg. Landb. Weekbl.* 1-3, 31: 1099.

VAN HALL, C. J. J. (*) — 1919 — De Koffiebessenboeboek. *Alg. Landb.-Weekbl. v. Ned. Indie*, Bandoeng, 3, 28: 980-982.

VAN HALL, C. J. J. (*) — 1923 — De Koffiebessenboeboek. *Alg. Landb. Weekblad voor Ned. Indie*, 7, 36: 1923-1926.

VAYSSIÈRE, P. — 1923 — Le scolyte du grain de café (St. coffeae Hag.) Extr. de l'Agronomie Coloniale. *Bull. de L'Inst. National d'Agr. Colon.* 70 et 71, 21 pp.

VAYSSIÈRE, P. — 1924 — Importance économique d'un parasite des grains de café: les cafés piqués. *Rev. d'Hist. Nat. Appl.*, 5: 26-32.

VAYSSIÈRE, P. — 1925 — Le Scolyte du grain de café au Brésil et la production de café dans les Colonies françaises. *Rev. Scient.*, 8: 241-248.

VUILLET, A. — 1914 — Le "Stephanoderes coffeae" à Libreville — Ravage commis sur les Caféiers Liberia. *L'Agr. Coloniale*, 1, 7: 19-21.

WURTH, TH. (*) — 1908 — De Koffiebessenboeboek. *Meded. van Alg. Proefst. voor te Salatiga.* 2: 3.

WURTH, TH. (*) — 1922 — Een Vuurvants (Dindymus rubiginosus F.) die Jacht op de Bessenboeboek maakt. *Meded. Koffiebessenboeboek-Fonds*, Soerabaya, 3: 43-61.

(*) Não consultado o original.

NOTAS SÔBRE A BIOLOGIA DE "ECPANTHERIA HAMBLETONI SCHAUS" (LEPID. ARCT.)

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampa 8

Em inspeção feita numa cultura de *Hibiscus sabdariffa* L., nas proximidades de Campinas, encontrou-se juntamente com um grupo de ovos, uma fêmea de *Ecpantheria hambletoni*, assim identificada por W. SCHAUS, do Museu Nacional dos Estados Unidos da América do Norte.

Por se tratar de espécie pouco conhecida, que se hospeda no algodoeiro, dado o interêsse que existe em obter o máximo de conhecimento quanto às pragas dessa cultura, foram feitas observações acerca de sua biologia.

As presentes notas, obtidas pelos funcionários auxiliares da Secção de Entomologia Agrícola, do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura (Instituto Biológico), Snrs. Benedito Luz Ribeiro e João Marcílio Junior, originam-se de observações realizadas em condições de insetário e com nossa integral assistência, de Fevereiro a Setembro de 1937.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

A não ser a postura encontrada em 17 de Fevereiro de 1937 sôbre *H. sabdariffa* L., uma lagarta já desenvolvida sôbre *Eriobotrya japonica* LINDL., em Maio de 1938, e outra sôbre *Gossypium hirsutum* L., em Março de 1940, oriundas todas do município de Campinas, não foram observadas na natureza outras plantas que servissem de alimento a essa espécie. No insetário obtiveram-se ciclos completos de muitos indivíduos também sôbre *H. rosa-sinensis* L., *H. esculentus* L., *Manihot utilissima* POHL., *Ricinus comunis* L. e *Bidens pilosa* L.. *H. sabdariffa* parece o hospedeiro preferido.

LONGEVIDADE DOS ADULTOS

As fêmeas alimentadas com água e mel vivem cerca de 5 dias mais do que os machos. A duração da vida dêstes variou de 2 a 21 dias, com a média de 12,3 dias. As fêmeas, em condições semelhantes, viveram entre 9 e 23 dias, com a média de 17,3 dias. Desprovidos de alimento, os machos viveram cerca da metade do prazo alcançado pelas fêmeas, ou sejam 16,2 dias para estas e 7,2 para aqueles.

OVIPOSIÇÃO

Os indivíduos utilizados para a observação da oviposição foram provenientes dos ovos encontrados no campo em 17/2/1937 e criados até o estádio adulto, em laboratório. Tais adultos foram colocados em grandes mangas de vidro com partes vivas de *H. sabdariffa* e *G. hirsutum* e supridos com partes iguais de água e mel, como alimento.

A cópula processou-se à noite e, cerca de vinte e quatro horas após, as fêmeas iniciaram a postura.

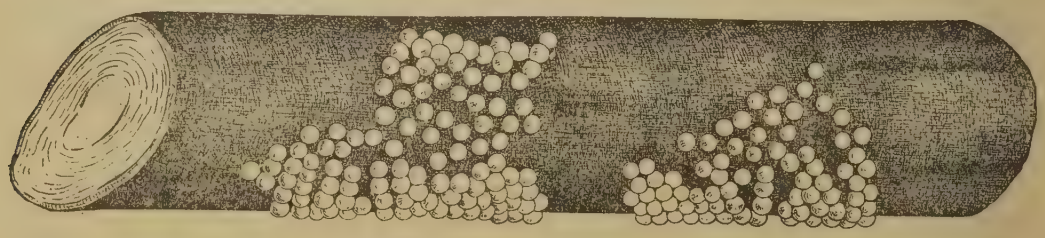


Fig. 1 — Grupo de ovos de *E. hambletoni* SCHAUS, sôbre *Hibiscus sabdariffa* L. × 5 (A. R. Mazza, del.).

Os ovos foram encontrados principalmente sôbre a página inferior das folhas, e mais raramente na superior, no pecíolo ou caule, tal como os achados na natureza; foram depositados em grupos, em número de 4 a 639 por grupo, e rarissimamente isolados. A postura diária variou entre 60 e 932 ovos, com uma média de 199. O total depositado por 6 fêmeas foi de 11.275 ovos, com a média individual de 1.879,1, durante o período de postura, que variou de 4 a 17 dias, com a média de 11 dias.

OVO

O ovo (Fig. 1) recemposto é esférico, de côr creme brilhante, tomando, durante o período de incubação, tonalidades que se vão pronunciando, até tornar-se violácea, por fim; córion reticulado, irisado, resistente e pouco transparente. Posturas, comumente em grupos, ou raramente isoladas, não protegidas. Medem em média 0,769 mm, variando as dimensões de 0,823 mm a 0,742 mm.

HÁBITOS DA LAGARTA

Para eclodir as lagartas róem o córion até lhe ser possível a emergência. Após a conveniente toalete, dispondo, com movimentos lentos, do aparelho bucal, as cerdas, permanecem sôbre o grupo de ovos, como que à espera do nascimento da maioria dos indivíduos, depois do que, comem o restante do córion. Algumas horas após começam alimentar-se da planta, ingerindo o parenquima das folhas, rejeitando as nervuras, com o que as deixam com o aspecto de um

tecido rendilhado. A alimentação processa-se quer de dia, quer de noite. Nas primeiras fases da vida larval, permanecem juntas, isolando-se depois de atingirem maior desenvolvimento.

TABELA 1

Duração dos estádios de *Ecpantheria hambletoni* SCHAUS de acôrdo com as verificações feitas de Fevereiro a Maio de 1937 — Campinas.

Fases da vida	Duração em dias			Número de indivíduos	Temperatura média em °C.
	Máxima	Mínima	Média		
Ovo	7	6	6,9	84	26,8
Larval	48	44	47,5	19	24,1
Prepupal	4	2	3,1	19	20,9
Ninfal	30	23	25,3	18	20,4
Ovo até adulto	88	77	84,2	11	22,7

Êste hábito, na natureza faz com que os indivíduos se dispersem sôbre o hospedeiro ou, devido à sua polifagia, procurem outros hospedeiros, o que, dada a exiguidade da população, as dispersa e consequentemente as torna pouco prejudiciais. Em laboratório, colocadas em caixas de Petri, individualmente, para observações do desenvolvimento, as lagartas ingeriam as exúvias após efetuadas as mudas.

São de movimentos lentos e, a-pesar-da quantidade dos pêlos que as recobrem, não causticam a pele humana.

Muitos indivíduos morrem durante as fases de evolução e nem sempre seu ciclo é uniforme: varia conforme o hospedeiro sôbre o qual se cria.

TABELA 2

Duração dos estádios de *Ecpantheria hambletoni* SCHAUS, de acôrdo com as verificações feitas de Maio a Setembro de 1937 — Campinas.

Fases da vida	Duração em dias			Número de indivíduos	Temperatura média em °C.
	Máxima	Mínima	Média		
Ovo	16	12	13,6	60	18,4
Larval	66	55	59,6	15	18,8
Prepupal	4	2	2,2	11	21,9
Ninfal	47	27	34,5	7	21,3
Ovo até adulto	133	106	116,8	7	18,7

DESCRIÇÃO DOS ESTÁDIOS LARVAIS

Para os indivíduos criados isoladamente em caixas de Petri, e observados às mesmas horas de cada dia, para êste fim, constataram-se 7 estádios larvais quando o alimento fornecido era constituido de folhas de algodão *(G. hirsutum)*, e 8, quando de vinagreira *(H. sabdariffa)*.

A duração dos estádios resume-se nas tabelas 3 e 4. Na tabela 3 são também mencionadas as dimensões das cápsulas da cabeça para os diferentes estádios.

1.º estádio — Cabeça castanho-escura ou preta, com pêlos esbranquiçados; palpos, antenas e clípeo esbranquiçados. Corpo, após o nascimento, amarelo-pálido; depois de ingerido o alimento, amarelo escuro, salientando-se as verrugas castanhas, providas de pêlos longos. Cerca da fase final dêste estádio, torna-se mais evidente uma faixa longitudinal esbranquiçada, marginada por duas outras amareladas, limitadas por sua vez nos 1.º, 2.º, 5.º, 6.º e 7.º segmentos abdominais, por uma expansão das verrugas de côr castanha; primeiro segmento torácico com a placa dorsal castanha.

2.º estádio — Placa do primeiro segmento torácico mais escura, com uma linha longitudinal na região mediana. Corpo alaranjado, mesclado de estrias esbranquiçadas e castanhas, de côr mais acentuada do que no estádio anterior na região das verrugas 2 e 3 dos 1.º, 2.º, 5.º, 6.º e 7.º segmentos abdominais; as demais verrugas são de tonalidade mais clara.

3.º estádio — Cabeça preta, lisa e brilhante. Placa do primeiro segmento torácico com a coloração da cabeça, excéto na parte correspondente à linha mediana dorsal. Corpo de côr alaranjada, menos intensa do que no estádio anterior; faixa dorsal esbranquiçada e mais larga, marginada por várias outras da mesma côr, interrompidas e limitadas por estrias castanhas; verrugas dos 1.º segmento torácico, 1.º, 2.º, 5.º, 6.º, 7.º e 9.º segmentos abdominais, castanho-escuras; as dos demais segmentos, alaranjadas. Placa sobreanal escura.

TABELA 3

Duração dos estádios larvais de *Ecpantheria hambletoni* SCHAUS, alimentados com folhas de *Gossypium hirsutum* L. — Maio a Julho de 1937 — Campinas.

Estádios larvais	Duração em dias			Número de indivíduos	Largura da cápsula da cabeça em mm		
	Máxima	Mínima	Média		Máxima	Mínima	Média
I	11	10	10,27	22	0,383	0,371	0,377
II	10	7	8,72	22	0,542	0,518	0,523
III	10	9	9,40	22	0,815	0,706	0,767
IV	8	6	7,40	22	1,411	1,104	1,117
V	9	7	7,18	22	2,119	1,739	1,902
VI	17	8	11,45	22	3,315	2,826	3,078
VII	12	10	11,00	7	4,625	4,429	4,519

4.º estádio — Cabeça semelhante à do estádio precedente. Corpo variegado de preto, branco e vermelho; verrugas do 1.º torácico, 1, 2 e 3 do 1.º segmento abdominal, bem como as verrugas 2 e 3 do 2.º, 5.º, 6.º e 7.º e as dorsais do 9.º segmentos abdominais, pretas e brilhantes; as demais, avermelhadas.

5.º estádio — Antenas com o segmento basal branco e o apical castanho; base dos palpos, castanha.

Verrugas dorsais semelhantes às do estádio anterior, com exceção das 2 e 3 do 8.º segmento abdominal, que são pretas; a 4.ª verruga acima dos segundo e terceiro pares de patas torácicas, castanho-escura; região ventral dos 1.º, 2.º, 7.º, 8.º e 9.º segmentos abdominais, com uma série de quatro verrugas castanhas.

6.º estádio — Corpo de côr escura a preta, provido de pêlos pretos e abundantes; faixa dorsal bem distinta e amarela, ladeada por duas outras mais estreitas, da mesma côr e interrompidas na zona das verrugas; duas outras linhas idênticas observam-se nas regiões espiracular e sub-espiracular; parte ventral, amarelo pálida, pontilhada de preto. Verrugas dos segmentos torácicos e todas as dorsais, pretas, exceto as 2 e 3 dos 3.º e 4.º segmentos abdominais, que acompanham a coloração avermelhada das demais. Placa sobreanal preta, com quatro proeminências também pretas.

TABELA 4

Duração dos estádios larvais de *Ecpantheria hambletoni* SCHAUS, alimentados com folhas de *H. sabdariffa* L. — Maio a Agosto de 1937 — Campinas

Estádios larvais	Duração em dias			Número de indivíduos
	Máxima	Mínima	Média	
I	13	10	11,00	20
II	12	9	10,25	20
III	12	8	9,45	20
IV	7	9	8,05	19
V	10	7	8,36	19
VI	13	8	10,15	19
VII	19	8	14,50	18
VIII (*)	18	17	17,50	2

(*) Nêste estádio a largura da cápsula da cabeça apresentou a dimensão média: 4,578 mm; as medidas máximas e mínimas foram: 4,758 mm e 4,429 mm respectivamente.

7.º estádio — Cabeça preta, lisa e brilhante, com cerdas de tamanho irregular, esparsamente distribuidas; sutura clara; ocelos pretos; clípeo claro; antenas com o primeiro segmento branco e o apical castanho-escuro; mandíbulas castanho-escuras; palpos com os dois primeiros segmentos branco, o terceiro segmento e o anal da base, castanhos. Corpo escuro, com pêlos abundantes; placa do primeiro segmento torácico, preta, com pêlos abundantes, com um sulco longitudinal claro; a faixa dorsal amarelo-clara distinta, ladeada por outras menos evidentes. O tegumento apresenta uma tenue tonalidade violácea, mais acentuada na região ventral. As verrugas torácicas e as dos 1.º, 8.º e 9.º segmentos abdominais, bem como as dorsais e supra-espiraculares dos segmentos restantes, pretas; as demais, vermelhas.

Entre lagartas do mesmo estádio observam-se diferenças de tonalidades na coloração das verrugas.

Estigmas evidentes e dourados. Placa anal e saliências, pretas.

Falsas patas, pretas, brilhantes, com as garras em semicirculo uniordinal.

Nêste estádio as lagartas têm em média 49,7 mm de comprimento, sendo as medidas máximas e mínimas 60 mm e 40 mm, respectivamente.

CASULO E CRISÁLIDA

Em tubos de vidro de 3 cm de diâmetro por 16 cm de comprimento, foram colocadas as lagartas completamente desenvolvidas, duas em cada um, separadas por um tampão de algodão, mantendo-se os tubos fechados nas extremidades por meio de um tecido fino. Igualmente, foram empregadas caixas de Petri de 10 cm (Estampa 8, fig. *A)*.

Nos tubos de vidro os casulos tecidos apresentaram forma aproximadamente oval, com cerca de 6 cm de comprimento e largura correspondente ao diâmetro do tubo; de coloração variável, do amarelo claro um pouco esverdeado, ao branco sujo, tinham na parte mais central a câmara de crisalidação, de forma também oval e de um tecido mais delicado.

Finda a construção do casulo, para o que são necessários 3 a 7 dias, a lagarta entra na fase prepupal, transformando-se depois de 2 a 4 dias, em crisálida. (Estampa 8, fig. *B)*.

Nas caixas de Petri os indivíduos criados isoladamente construiram os casulos com forma ligeiramente diferente e medindo 5 cm de comprimento por 4 cm de largura. A câmara de crisalidação situava-se na porção central de um conjunto de camadas de teia dispostas concentricamente, conforme se vê na Estampa 8, fig. *A)*.

Indivíduos criados sôbre vinagreira e algodoeiro, e protegidos com grandes gaiolas de tela, no campo, depois de atingirem à maturidade larval abandonaram as plantas e construiram os casulos, geralmente isolados, sôbre as partes mais protegidas das gaiolas, em posições variadas. Tinham, porém, dimensões semelhantes às observadas no laboratório.

A crisálida, logo depois de formada, é de côr amarela, tornando-se alaranjada, castanho-clara e finalmente castanho-escura. Cabeça angulosa, com as porções definidas e distintas, océlos salientes. Protórax, bem como o mesotórax, lisos; metatórax e segmentos abdominais, com pontuações; certa cerosidade pode ser vista sôbre a região torácica e principalmente no abdomem; cremaster provido de uma série de ganchos, em média 47, variando, porém, segundo verificações em 10 crisálidas, de 40 a 55. A crisálida é imovel, medindo em média 21,24 mm de comprimento por 8,99 mm de largura.

Para as crisálidas obtidas nas gaiolas, conseguiu-se um inimigo natural, que foi identificado por A. B. GAHAN, do Museu Nacional dos Estados Unidos da América do Norte, como espécie do gênero *Eurytoma (Hym. Eurytomidae)*.

DESCRIÇÃO DO ADULTO

Conforme publicação nos Ann. Mag. Nat. Hist. (11) vol. II, pg. 504, de Novembro de 1938, a descrição do adulto por W. SCHAUS é a seguinte (Estampa 8, fig. *C)*.

"A espécie pertence ao grupo das antenas pectinadas.

Macho — Antena preta, com a base da parte delgada branca. Cabeça branca. Colar e torax cinzento-enfumaçado-pálido, com uma linha dorsal delicada, de côr preta, e linhas semelhantes, sub-dorsal e lateralmente, sôbre a patágia. Abdomem, dorsalmente azul escuro e ventralmente branco.

Patas com linhas delicadas pretas e pequenas manchas. Asas anteriores na face dorsal, com as regiões costal, basal e interna branca opaca; a costal com manchas delicadas de côr cinzento-amarelada-pálida, marginadas com linhas pretas delicadas; há, na região basal, manchas oblíquas, cinzentas enfumaçadas, abaixo da costal e próximas da base da margem interna; manchas semelhantes também se encontram, porém mais direitas, postmediana e subterminalmente; no mais a asa é hialina.

Asas posteriores hialinas em cima e largamente brancas e opacas na margem interna; ventralmente as asas são semelhantes. Zona costal das asas posteriores branca e opaca, com duas pequenas manchas pretas.

Fêmea — Corpo semelhante ao do macho. Asas anteriores de coloração branca um tanto suja, com manchas cinzentas enfumaçadas marginadas com linhas delicadas e pretas; manchas basais oblíquas maiores do que no macho; mancha antemediana da região costal grande, curvada para fora, e na célula, curvada para dentro; linha mediana constituida de manchas menores e curvas; manchas subterminais maiores, da nervura 4 à zona costal; pequenas manchas terminais nos intervalos.

A página inferior da asa anterior muito semelhante à superior. Asa posterior com a região costal largamente branca, na qual se acham duas manchas pretas e amplas.

Envergadura: Macho 51 mm; Fêmea 65 mm".

BIOLOGICAL NOTES ON "ECPANTHERIA HAMBLETONI SCHAUS" (LEPID. ARCT.)

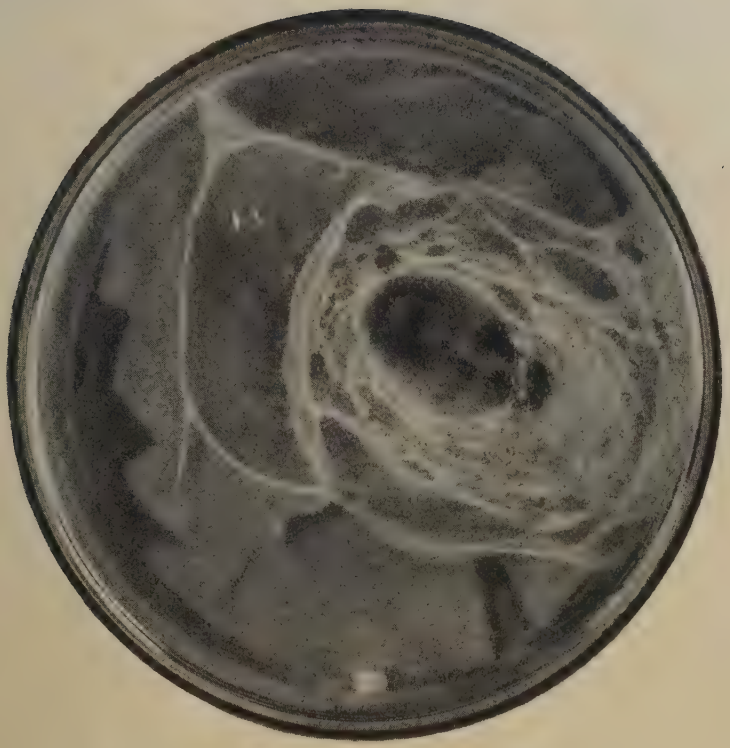
Abstract

In this paper some data on the Arctiidae E. hambletoni Schaus are recorded. This insect is a pest of Hibiscus sabdariffa L., Eriobotrya japonica Lindl. and Gossypium hirsutum L. in the State of S. Paulo, Brazil. Under laboratory conditions the larva of this species was also bred on a few other host plants and one natural enemy of the chrysalid was found.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 8

Ecpantheria hambletoni SCHAUS

Fig. A — Casulo, em caixa de Petri. (autor fot.).
Fig. B — Crisálida, × 3. (autor fot.).
Fig. C — Fêmea, × 1,2. (Hambleton fot.).



A

B

C

Vol. 14 — Art. 5 Dezembro de 1943

VACINAÇÃO E MORTALIDADE NA CÓLERA AVIÁRIA

POR

J. Reis e R. C. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em colaboração com NÓBREGA, um de nós (J. R.) demonstrou a possibilidade de imunizar solidamente contra a cólera aviária por meio de duas inoculações, convenientemente intervaladas, de vacina preparada com amostra "azul" de *Pasteurella avicida* (2). Tratando-se porém, de vacina viva, é natural que seu uso reclame sempre cautelas especiais, impondo-se ao mesmo tempo a realização de estudos e observações epidemiológicas sôbre o comportamento dos animais vacinados quando colocados em meio indene e em ambiente contaminado.

Embora a vacina referida seja comprovadamente inócua nas doses recomendadas, tem-se às vezes observado que sua aplicação em certos momentos da epidemia, especialmente no início, acarreta sensível aumento de mortalidade.

Outra questão importante é a que diz respeito à porcentagem de portadores aparentemente sãos nos lotes vacinados e não vacinados.

Porcentagem de portadores em lotes vacinados e não vacinados

De um lote de 99 frangos Leghorn, brancos, de 8 semanas, 49 foram vacinados com a vacina 109 T e os restantes, em número de 50, ficaram com êles misturados, sem tratamento algum. A vacinação consistiu na inoculação intramuscular, em cada ave, e com intervalo de 7 dias, de 1 cm.^{3} de cultura em caldo de 24 horas, da amostra P 109 T, diluída respectivamente a 1:10 (1.ª dose) e 1:5 (2.ª dose).

Trinta e seis dias após a data da última inoculação de vacina, todas as aves, vacinadas e não vacinadas, foram inoculadas, na fenda palatina, com 0,5 cm^3 de cultura virulenta de *Pasteurella avicida* (P 307, amostra fluorescente).

Durante os dois meses que se seguiram à inoculação da amostra virulenta houve 19 mortes no lote não vacinado e 4 no vacinado. A pasteurela fluorescente não foi, porém, isolada de todos os cadáveres: dos 19 não vacinados, só 11 deram cultura positiva; dos 4 vacinados, nenhum deu cultura positiva. Êstes resultados confirmam tanto a inocuidade quanto a eficácia (valor imunizante) da vacina.

Nos dois meses de observação acima referidos, durante os quais a infecção se manteve no lote, fizeram-se dois exames, em épocas diferentes, para pesquisa de portadores aparentemente sãos.

A primeira pesquisa foi realizada 9 dias após a contaminação do lote com a amostra virulenta, e se limitou apenas a 10 dos frangos vacinados, tomados ao acaso; encontraram-se 3 portadores, tendo sido a presença da *Pasteurella avicida* no muco da fenda palatina verificada por inoculação em pombo, segundo a técnica de NÓBREGA e REIS (1).

A segunda pesquisa, realizada 1 mês após a primeira, abrangeu um total de 87 frangos, dos quais 49 previamente vacinados e 38 não vacinados. Entre os vacinados encontrou-se 1 portador; entre os não vacinados, dois.

Importa ainda notar que de nenhum dos animais vacinados se isolou, em momento algum, seja dos órgãos (cadáveres), ou do muco bucal (portadores), outra amostra de pasteurela que não fôsse a fluorescente. A amostra azul, da vacina, não se localiza na fenda palatina, conforme aliás já tem sido repetidas vezes observado por NÓBREGA e por um dos autores (J. R.).

Das observações acima referidas pode-se concluir seguramente:

a) a vacina 109 T possue elevado poder imunizante;
b) a vacinação com amostra 109 T não cria portadores dessa amostra;
c) as aves vacinadas, quando infetadas com a forma virulenta da *Pasteurella avicida*, podem, como as não vacinadas, ficar portadoras dessa forma;
d) tanto nos lotes vacinados quanto nos não vacinados é possível encontrar portadores 1 mês após a contaminação das aves.

EFEITO DA VACINAÇÃO EM AVES RECEM-INFETADAS

Aos autores pareceu que as elevadas mortalidades verificadas em lotes vacinados logo no início da doença, quando se observam as primeiras mortes, pudessem ser explicadas pela presença, nesse momento, de um grande número de aves contaminadas, mas ainda não doentes (fase de proliferação inicial do germe na fenda palatina e luta contra as barreiras naturais que aí se encontram). Para essas aves, contaminadas com a pasteurela virulenta na fenda palatina, a inoculação da vacina poderia funcionar como fator adjuvante da infecção, determinando baixa da resistência geral, embora idêntico fenômeno não tenha sido observado com o uso de vacinas mortas, em condições semelhantes.

Com efeito, as pesquisas epidemiológicas feitas pelos autores em vários surtos de cólera, acompanhados desde o início, e nos quais a pesquisa de pasteurela no muco foi realizada muito precocemente, têm

demonstrado, de maneira insofismável, que logo no começo da epidemia há uma extensa e quase total contaminação do lote infetado, mesmo quando a mortalidade ainda é relativamente baixa.

Quarenta e nove galinhas foram inoculadas na fenda palatina (instilação) com amostra virulenta, fluorescente, de *Pasteurella avicida* (P 307), recebendo cada ave 0,5 cm.³ de uma cultura em caldo, de 24 horas. Três das aves, cuja abóbada palatina fôra acidentalmente ferida na ocasião da instilação, morreram em 24 horas.

No dia seguinte 9 das aves foram submetidas a exame para pesquisa de *Pasteurella avicida* no muco da fenda palatina, de acôrdo com a técnica de NÓBREGA e REIS, por inoculação em pombos (1). Oito dessas aves apresentaram pasteurela no muco, e estavam, pois, contaminadas; quatro delas vieram a morrer mais tarde. A galinha que, na ocasião dessa prova, não revelara pasteurela no muco, veiu a morrer também mais tarde, provavelmente contaminada depois do exame.

No dia imediato ao do exame, inoculou-se a 1.ª dose de vacina 109 T (1 cm.³ de diluição a 1:10 de cultura-caldo de 24 horas) em 20 aves, tomadas ao acaso. Ao mesmo tempo, dessas mesmas 20 aves, e mais de 19 não inoculadas com vacina, colheu-se o material (muco da fenda palatina) necessário à pesquisa do germe.

Mortalidade: — A mortalidade observada nos 4 dias seguintes, entre as aves vacinadas e não vacinadas, está representada no quadro abaixo.

QUADRO

Mortalidade comparada de aves vacinadas e não vacinadas, em lote recentemente infetado

	Vacinadas	Não vacinadas
Mortas	8	1
Sobreviventes . . .	12	18
Totais	20	19

Aplicando aos dados acima a prova do X^2, com a correção de Yates por existirem, no quadro, frequências pequenas, temos:

$P\ (X^2 > 4{,}83904) = 0{,}02804$

Não há dúvida que a vacinação aumentou a mortalidade entre as aves vacinadas.

Presença do germe no muco — Das 8 aves vacinadas que morreram, quatro haviam revelado presença de pasteurela no muco palatino, quando examinadas no momento da vacinação; das 12 vacinadas que não morreram, nenhuma havia revelado a presença de

pasteurela. Das aves não vacinadas, a que morreu havia revelado pasteurela no muco palatino, ao passo que das 18 sobreviventes duas apresentavam pasteurela (uma destas veiu a morrer mais tarde, após o têrmo da experiência).

E' preciso ainda notar que das aves vacinadas que morreram, só duas o fizeram em prazo superior a 24 horas; essas duas não haviam revelado pasteurela na fenda palatina.

Todas as aves acima referidas como mortas, sucumbiram de cólera, delas se havendo isolado a pasteurela virulenta.

E' de notar, como fato curioso, terem morrido 4 aves que, no momento da vacinação, não apresentavam pasteurela na fenda palatina. Tais aves, no momento da vacinação, deviam, entretanto, estar infetadas, pois morreram de cólera no dia seguinte. Dada a grande sensibilidade da prova da inoculação em pombo, é de admitir-se uma esterilidade real do muco em relação à pasteurela; se assim fôr, êsses animais estariam em uma fase curiosa, em que a pasteurela, havendo vencido as primeiras barreiras e penetrado os tecidos, houvesse desaparecido da superfície da fenda palatina, em que fôra depositada.

Também é curioso comparar as frequências, em dois dias consecutivos, de aves com pasteurela na fenda palatina. Com efeito, os dados já acima apresentados deixaram claro que, no primeiro dia após a inoculação das aves na fenda palatina, era possível encontrar a pasteurela em 8 das 9 aves examinadas. Já no dia seguinte, porém, o número de aves com pasteurela era de 7 em um total de 39.

Do exposto podemos concluir que após a contaminação da fenda palatina, o germe aí permanece, na quase totalidade dos casos, por umas 24 horas. Após êsse prazo, ocorrem duas possibilidades, isto é, ou a permanência do germe, ou o seu eclipse, sem que esta última ocorrência importe, necessáriamente, numa esterilização infalivel do organismo em relação à bactéria, embora na maioria das vezes isso na verdade ocorra.

E' nessa fase de permanência i n i c i a l do germe na boca que a inoculação da vacina pode, segundo toda a evidência, provocar a morte de aves que talvez pudessem, por suas próprias fôrças, destruir a pasteurela e evitar-lhe a penetração em seus tecidos. Nesse momento, é desaconselhável, pois, a aplicação da vacina, que viria certamente aumentar a mortalidade, sacrificando aves que possivelmente se esterilizariam.

E' interessante assinalar aquí que essa fase de permanência inicial não deve ser confundida com a que se estabelece mais tarde, em certas aves que se tornam p o r t a d o r a s a p a r e n t e m e n t e s ã s. As relações entre organismo e bactéria são diferentes nos dois

casos, sendo muito maior, no caso da portadora, a resistência da ave à ação do germe. De fato, numerosas experiências e observações, feitas pelos autores e por NÓBREGA, em épocas diversas e com amostras diversas de pasteurelas virulentas, têm demonstrado que a vacinação de aves portadoras, com a amostra 109 T, não provoca a morte dessas aves, como acontece no caso da vacinação de aves recentemente contaminadas.

CONCLUSÕES

Na luta contra a cólera é portanto necessário agir com a máxima prudência, só intervindo com a vacinação pela vacina viva (109 T) e com a pesquisa de portadores, depois que a epidemia, tendo atingido o fastígio, manifeste tendência para declínio, ou estabilização em um nível baixo de mortalidade.

Perguntar-se-á, talvez, qual o sentido dessas duas medidas, supostamente preventivas, quando, para aplicá-las, é necessário esperar que a epidemia decline. A explicação é simples: essas medidas são preventivas, não em relação à epidemia que surge, mas em relação às futuras epidemias que, como é sabido, reaparecerão sistemáticamente nos aviários assolados, se não se fizer, de maneira radical, a eliminação do germe. Para conseguir êsse fim é que se recorre à eliminação de portadores, feita pela técnica de NÓBREGA e REIS (1), precedida da vacinação com vacina viva; esta última produz imunidade sólida, porém não duradoura, e na prática poderá, em regra, ser aplicada com segurança assim que, no lote infetado, as mortes comecem a espaçar-se.

Quaisquer que sejam as limitações, como as acima apontadas, impostas ao método de combate à cólera pela associação das duas medidas que têm sido largamente usadas e preconizadas por NÓBREGA e REIS (1, 2), isto é, a vacinação com germe vivo e a eliminação de portadoras, não se pode, até hoje, fugir à evidência de que essas na verdade representam, como salientou um de nós (3), as duas medidas básicas da campanha profilática contra tão grave e devastadora doença.

INCREASE IN MORTALITY FOLLOWING VACCINATION AGAINST FOWL CHOLERA

Abstract

The authors report that mortality due to fowl cholera may be highly increased when a living vaccine (109 T) is applied to the flock at the onset of the epidemic.

Carefully controlled experiments have shown this to be due to the presence, in the early stages of the epidemic, of a large number

of birds which harbour the fowl-cholera micro-organism in the palatine cleft. Such birds should not be considered as "healty carriers"; they merely are "contaminated" birds, whose fate is depending on their success in holding back the infective agent at the first barrier it is faced with. As soon as their natural resistance is lowered by the inoculation of the living vaccine the birds are no longer able to fight back the microbes and acute fowl cholera results therefrom.

The fowl cholera microorganism was shown to disappear in a very short time from the mouth cavity of the majority of the contaminated birds.

The healhty carriers, which are birds in whose mouth cavity teh microorganism succeded in becoming established, are able to withstand with no harmful effects the inoculation of the living vaccine.

Previous vaccination of birds with the living vaccine does not prevent them from becoming carriers when exposed to fowl cholera infection.

From their experiments and observations the authors draw the following practical conclusions:

1) the living vaccine should not be applied during the first stages of the epidemic, lest one migt risk losing many birds which otherwise would escape infection and death.

2) the test for the detection of healtly carriers only should be performed after the fastigium of the epidemic, when it begins to subside.

BIBLIOGRAFIA

1 — Nóbrega, P. e J. Reis — 1937 — Sôbre o reconhecimento de portadores na cólera aviária e a persistência da Pasteurella avicida nesses animais. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 8: 183-188.

2 — Nóbrega, P. e J. Reis — 1938 — Vacinação contra cólera aviária com amostra viva (tipo azul) de Pasteurella avicida. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 9: 77-84.

3 — Reis, J. — 1939 — Duração da imunidade conferida por injeções simultâneas de Pasteurella avicida e sulfanilamida. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 10: 301-303.

4 — Reis, J. e P. Nóbrega — 1941 — Ensaios de vacinação contra a cólera aviária. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 12: 81-85.

———o———

Vol. 14 — Art. 6 Dezembro de 1948

IMPORTANCIA DA ORIGEM DOS CAMONDONGOS USADOS PARA INOCULAÇÕES DE TUMORES TRANSPLANTAVEIS

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em diversas experiências com dois adenocarcinomas que estão sendo mantidos no Instituto Biologico, supoz-se que os resultados irregulares que as vezes se seguiam às inoculações fossem devidos à diversidade de procedência dos camondongos usados. A verificação dessa possibilidade tem certa importância por poderem ser atribuidas a outras causas as diferenças que se observam no decurso de pesquizas experimentais, quando não se toma em consideração a origem dos camondongos empregados. Porisso, com o intuito de fazer um juizo definitivo sôbre o assunto, procedemos a diversas inoculações comparativas desses dois tumores, em duas linhagens de camondongos, que estão sendo criadas separadamente. Os tumores usados são adenocarcinomas mamários que apareceram na denominada linhagem Trapp e, tanto quanto é possível notar, não apresentam diferenças morfológicas ou de caráter biológico. Ambos são transplantaveis e pouco virulentos. Quando estas experiências foram iniciadas, contavam apenas cinco passagens em série. Os fragmentos dêsses tumores crescem com facilidade ao serem enxertados em camondongos susceptiveis e atingem seu desenvolvimento completo entre quatro e oito semanas.

As duas linhagens usadas para as inoculações são as que designámos respectivamente pelos nomes de "linhagem P. Bueno" e "linhagem Trapp". A primeira (linhagem P. Bueno) está sendo criada ha cerca de dez anos e é constituida por descendentes resultantes de cruzamento entre fêmeas fornecidas pelo biotério da Faculdade de Medicina de S. Paulo e machos oriundos da criação do Laboratório Dr. J. Maciel. A segunda (linhagem Trapp) descende de camondongos da Fundação Rockefeller, do Rio de Janeiro. Ambas são mantidas em salas independentes e estão a cargo de tratadores com instruções adequadas afim de evitar possibilidades de cruzamento entre seus representantes.

Método das inoculações: — As experiências consistem em tomar descendentes dos dois tumores desenvolvidos da linhagem Trapp, 3 a 4 semanas após seu transplante, isto é, quando tinham cerca de 1 cm de diâmetro. Cada tumor era dividido em 20 fragmentos do mesmo tamanho e inoculado em 20 camondongos, sendo 10 da linhagem Trapp e 10 da linhagem P. Bueno. Tanto a colheita

do material como as inoculações eram feitas assepticamente. Cada fragmento era introduzido numa pequena loja feita com pinça e tesoura sob a pele da região axilar direita, e a loja fechada por meio de um agrafe de Michel e protegida com uma camada de colódio. Os camondongos, enxertados sob anestesia pelo eter, postos em caixas separadas conforme as linhagens, e levados a uma sala onde ficavam sob as mesmas condições de ambiente e de alimentação, eram semanalmente submetidos a exame, anotando-se os resultados de cada transplante.

O quadro seguinte contém o registro de todos os tumores que se desenvolveram nas duas linhagens.

Inoculações de dois adenocarcinomas transplantaveis, feitas em duas linhagens puras de camondongos, afim de verificar comparativamente a suscetibilidade de ambos ao desenvolvimento dos transplantes tumorais

N.º das inoculações	Tumores usados para os enxertos	Camondongos e linhagens enxertadas	Sobreviventes no fim de três meses	N.º de tumores que se desenvolveram	Porcentagens de resultados positivos
698	Trapp n.º 2	10 P. Bueno 10 Trapp	9 10	0 5	0 % 50,00%
689	Trapp n.º 2	10 P. Bueno 10 Trapp	10 9	0 8	0 % 88,8 %
699	Trapp n.º 2	10 P. Bueno 10 Trapp	10 10	0 8	0 % 80,0 %
700	Trapp n.º 2	10 P. Bueno 10 Trapp	10 7	1 7	10,0 % 100,0 %
691	Trapp n.º 1	10 P. Bueno 10 Trapp	10 10	0 5	0 % 50,00%
692	Trapp n.º 1	10 P. Bueno 10 Trapp	10 8	1 7	10,0 % 87,50%

Os dados do quadro anterior podem ser resumidos do seguinte modo:

Em 59 camondongos da linhagem P. Bueno — 2 tumores, ou sejam 3,38% de resultados positivos.

Em 54 camondongos da linhagem Trapp — 40 tumores, ou sejam 74,07% de resultados positivos.

Como se vê, apenas dois foram os enxertos que se desenvolveram em 59 sobreviventes da linhagem P. Bueno, ao passo que entre os 54 sobreviventes da linhagem em que os tumores apareceram espontaneamente, os enxertos deram 40 tumores. Os dois camondongos da linha-

gem P. Bueno em que as inoculações resultaram em tumor, tinham abcessos pulmonares; o baço e os gânglios subcutâneos estavam francamente aumentados, tudo fazendo pensar num processo infeccioso com forte reação no sistema reticulo-endotelial.

A resistência de animais pertencentes a linhagens diferentes, quando inoculados com tumores transplantaveis da própria espécie, já é fato conhecido. Foi verificada nas primeiras inoculações do sarcoma da galinha, descrito por P. ROUS (3) e em diversos tumores transplantaveis de camondongos, estudados por H. B. ANDERVONT (1). Observação semelhante foi por nós registrada (2) relativamente a um adenocarcinoma do camondongo, que encontramos em 1938.

As verificações do presente trabalho indicam que os representantes da linhagem P. Bueno são nitidamente resistentes aos adenocarcinomas que apareceram e que são facilmente transplantaveis nos representantes da linhagem Trapp; deve-se pois ter sempre em vista a procedência dos camondongos quando se realizam as inoculações para fins experimentais ou mesmo para a simples manutenção de tumores.

ON THE IMPORTANCE OF THE ORIGIN OF MICE USED IN EXPERIMENTS CARRIED OUT WITH TRANSPLANTABLE TUMORS

Abstract

This paper refers to inoculations carried out into two strains of mice, to determine their susceptibility to the growth of two mammary adenocarcinomas spontaneously developed in one of them. The strain where the tumors appeared is called Trapp strain, and descends from mice obtained five years ago in the laboratory of the Rockefeller Foundation at Ric de Janeiro. It consists of albino mice and their adult females show an incidence of about 4% of spontaneous mammary tumors. About 74% of the mice of this strain developed tumors when inoculated with the material used for this purpose. The other, called P. Bueno strain, is represented also by albino mice and results from cross breedings of females of the Faculty of Medicine of S. Paulo and males procured in the Dr. J. Maciel Laboratory. Descendants of this strain did not develop spontaneous tumors since 1932, and after the inoculations of the same material used in the other strain, only about 4% of the transplantations resulted in tumors.

According to these figures and for the purpose of further studies to be mentioned in another paper, the Trapp strain was considered susceptible, while P. Bueno strain was considered resistant to the development of the transplanted tumors which are being mantained in this laboratory.

BIBLIOGRAFIA

1 — ANDERVONT, H. B. — 1933 — The Specificity of Immunity elicited by Mouse Sarcoma 180. *Public Health Reports*, Washington D. C., 48: 1472-1476.

2 — MEYER, J. R. — 1942 — Estudos feitos com um segundo adenocarcinoma transplantavel do camondongo, encontrado no Instituto Biologico. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 13: 127-136.

3 — ROUS, P. — 1910 — A Transmissible Avian Neoplasm. *J. Exp. Med.*, N. York, 12: 696-712.

Vol. 14 — Art. 7 Dezembro de 1943

A REAÇÃO LEUCOCITÁRIA PROVOCADA POR ENXERTOS DE ADENOCARCINOMA EM CAMONDONGOS DE LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETIVEL AO TUMOR

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 9-10

Em experiências feitas com o propósito de verificar a atuação de diversas substâncias sôbre a vitalidade de enxertos de um adenocarcinoma transplantavel de camondongo, tivemos ocasião de notar que a falta de desenvolvimento dos fragmentos enxertados coincidia muitas vezes com o aparecimento de abcessos nos pontos de inoculação. Com o propósito de saber se em animais de uma linhagem resistente, criada no laboratório pelo Dr. P. BUENO, o fracasso no desenvolvimento do material viavel enxertado também estava ligado a uma reação constituida por neutrófilos, fizemos diversas inoculações, comparando o comportamento morfológico microscópico dos tecidos de camondongos, com o de uma outra linhagem em que os enxertos dêsse mesmo tumor se desenvolvem com muita facilidade.

O tumor usado tem os característicos típicos de um adenocarcinoma mamário e apareceu espontaneamente numa criação a êsse tempo a cargo do Dr. E. TRAPP. Os pedaços dêsse tumor mostram-se facilmente transplantaveis nos representantes dessa linhagem.

Ambos os grupos de camondongos usados para estas verificações pertencem a duas colónias, de patrimônios hereditários diferentes, as quais estão mantidas separadamente há vários anos, de modo a ficar impedido o cruzamento entre seus representantes. Em outro trabalho (3) tivemos oportunidade de publicar a origem desses dois grupos, respectivamente resistente (linhagem P. Bueno), e suscetivel (linhagem Trapp), mostrando os resultados dos enxertos de adenocarcinomas mamários em cada um deles.

Método: — As experiências consistiram em tomar pedaços de um mesmo adenocarcinoma transplantavel, em dividi-lo em fragmentos aproximadamente do tamanho de um grão de arroz, e em enxerta-los asseticamente em grupos de camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) e da linhagem suscetivel (Trapp). Êsses enxertos ou inoculações eram feitos sob anestesia pelo eter e em grupos de dez camondongos machos de cada linhagem, sendo os camondongos, para cada inoculação, sempre da mesma idade e castrados cerca de um mês antes. De cada grupo tomavamos o mesmo número de camondongos 24, 48, 96 horas e 8 dias depois das inoculações, sacrificando-os com clorofórmio para colheita do material a ser

estudado. Depois de mortos, os animais eram extendidos numa pequena táboa e toda a pele da região onde os enxertos haviam sido feitos era depilada com uma solução de monosulfureto de sódio. O material assim preparado, depois de feitas duas injeções da solução fixadora, respectivamente no torax e na cavidade abdominal, era posto numa solução a 20% de formol e levado a uma estufa a 50° C. Depois de uma permanência nesse líquido, durante um período de cinco a seis horas, toda a região dos enxertos era retirada com a respectiva parede torácica e colocada numa solução de formol a 20%, para a fixação definitiva.

O material era incluido em parafina e os cortes corados pelos processos habituais da técnica histológica. Em alguns casos foram também feitos cortes de congelação e colorações pelo método da peroxidase.

As observações microscópicas dos cortes de enxertos em camondongos resistentes e de camondongos da linhagem suscetivel estão resumidos nos seguintes itens:

ENXERTOS DE 24 HORAS — Camondongos resistentes: — Com 24 horas, os pedaços de tumor introduzidos nos camondongos resistentes apresentam os caracteres próprios do tecido neoplástico em plena vitalidade. Além do inóculo propriamente dito, que aparece na loja feita sob a pele para sua manutenção e crescimento, vêem-se pequenos grupos ou agregados de celulas neoplásicas dele, em contacto com a superfície interna da loja inoculada. Entre a superfície interna da loja e o inóculo propriamente dito vê-se um espaço cheio de líquido albuminoso com hemátias, alguns mononucleares e numerosos leucocitos neutrófilos. No tecido conjuntivo que forma a parede da loja de inoculação, isto é, no tecido que pertence ao hospedeiro resistente, há uma nítida infiltração edematosa, células conjuntivas tumefeitas, hemátias extravasadas e grande número de leucocitos neutrófilos, de preferência localizados nas proximidades de capilares sanguíneos.

Camondongos suscetiveis: — Os cortes da região enxertada em camondongos suscetiveis mostram os mesmos caracteres acima referidos quanto aos camondongos resistentes, não sendo possível notar diferenças dignas de registro entre os cortes de enxertos em camondongos pertencentes a uma e outra linhagem.

ENXERTOS DE 48 HORAS. — Camondongos resistentes: — Nos inóculos propriamente ditos, já se vêem grandes áreas em necrobiose com nucleos picnóticos, figuras de cariorrexis e de cariolise bem como numerosos fragmentos de cromatina desintegrada. Os vasos do inóculo mostram-se dilatados e com o conteúdo hialinizado. Na superfície dos pedaços inoculados ainda se vê, entre êles e o tecido conjuntivo do hospedeiro um espaço vasio tendo ocasionalmente raras células livres com caracteres de células conjuntivas livres ou mononucleares e de leucocitos neutrófilos. No tecido conjuntivo do hospedeiro, nas proximidades dos inóculos ainda se vêem os agregados celulares que apareciam nos enxertos com 24 horas de desenvolvimento, porém os elementos tumorais agora já são mais escuros, teem inúmeros núcleos picnóticos, e geralmente os agregados celulares que se destacaram dos inóculos já se acham completamente envoltos por tecido conjuntivo intensamente infiltrado por leucocitos neutrófilos, linfocitos e células locais recem-formadas. No interior dos próprios agrupamentos celulares e entre os elementos epiteliais em necrobiose também já se encontra uma franca infiltração leucocitária formada por neutrófilos. (Estampa 9: A, B, E, e estampa 10: G, H, I).

Camondongos suscetiveis: — Na porção central os fragmentos inoculados também apresentam vasos com cavidade dilatada e cheios de material de aspecto hialino. Há grandes áreas de necrose e de necrobiose com abundante destruição nuclear. Não se vêem leucocitos neutrófilos. Na periferia dêsses inóculos vêem-se diversas áreas de tecido tumoral conservado e já em franca hiperplásia. A parede conjuntiva que envolve os inóculos mostra agregados de células neoplásicas em hiperplasia e um tecido conjuntivo com fibroblastos recemformados tendo poucos linfocitos e rarissimos neutrófilos. Os espaços existentes entre os fragmentos enxertados e o tecido conjuntivo do hospedeiro estão reduzidos à frestas menores ou ocupados por material albuminoso com rarissimas células, ou por uma rêde fibrinosa tendo apenas linfocitos em número relativamente pequeno (Estampa 9: D, E, F e estampa 10: J, K, L).

ENXERTOS DE 96 HORAS E MAIS. — Camondongos resistentes: — Com o correr do tempo os pedaços inoculados são invadidos, com o progresso das necroses, por numerosos neutrófilos que se acumulam em grande quantidade ao redor dos inóculos. Desaparecem os espaços existentes entre os pedaços enxertados e o tecido conjuntivo do hospedeiro. Desaparecem também os agregados de células tumorais que ainda eram visiveis com 48 horas de desenvolvimento, tomados por processo de necrose, infiltração leucocitária e fibrose. Ao redor do valo leucocitário que se forma em tôrno dos inóculos, desenvolve-se um tecido de granulação que cresce até substituir completamente o sequestro existente em seu interior. Nos casos que serviram para êste estudo nunca se observou processo de supuração com escoamento purulento.

Camondongos suscetiveis: — A' medida que as células necrosadas do centro do inóculo se vão tornando hialinas, as células periféricas vão crescendo, de modo a encher o espaço que antes existia entre os fragmentos introduzidos e o tecido conjuntivo do hospedeiro. O tecido tumoral recemformado aí emite prolongamento que penetram irregularmente no tecido conjuntivo ambiente. Ao mesmo tempo os agrupamentos de células tumorais que apareciam sob a forma de pequenos agregados aumentam de tamanho, confluem e acabam unindo-se com as partes proliferadas da periferia do inóculo. Por êsse tempo vê-se um tecido conjuntivo tumoral denso, formado quasi exclusivamente por fibroblastos em diversos estágios de evolução. Êsses fibroblastos são, em alguns campos, arredondados e de núcleos vesiculosos, e em outros, fusiformes tendo núcleos densos e dotados já de certa quantidade de substância colágena. Com êsse tecido penetram pequenos vasos nas áreas tumorais neoformadas. Por êsse tempo não mais se vêem neutrófilos nem ao redor nem no interior do tumor.

Em resumo pode-se dizer que ha uma diferença de reação celular microscópicamente apreciavel entre os camondongos da linhagem resistente e os da linhagem suscetivel. Nos primeiros nota-se uma franca reação leucocitária em torno dos inóculos, ao passo que nos segundos, apenas se veem poucos neutrófilos e algumas células semelhantes a linfocitos e uma discreta proliferação de elementos conjuntivos.

A' primeira vista poder-se-ia pensar que a reação leucocitária fôsse consequência da necrose das células tumorais. Contra essa interpretação há duas evidências dignas de registro: a primeira consiste em aparecer a reação leucocitária não só em tôrno dos inóculos introduzidos, mas também ao redor dos agregados de células tumorais que crescem a princípio no tecido conjuntivo dos hospedeiros, nas visinhanças da loja feita para a introdução dos fragmentos enxertados; a outra consiste em uma observação não registrada nas descrições referidas e que concerne ao fato de não se notarem acúmulos leucocitários em tôrno dos inóculos feitos com o material morto pelo calor em camondongos suscetiveis. Se a necrose fôsse a causa da reação leucocitária, essa reação deveria aparecer em tais casos.

Outro ponto que nos parece digno de registro é que, quando se provoca uma reação leucocitária intensa ao redor dos inóculos em camondongos suscetiveis, por meio da essência de terebentina que provoca intensa reação leucocitária, os inóculos deixam de se desenvolver, ou só muito tardiamente o fazem.

Sob a influência da repercussão que tiveram as idéias de J. B. MURPHY (5), outros autores como B. E. BRUEDA (1, 2) e MILONE (4) acham que a defesa de um animal contra enxertos tumorais se faz por intermédio do baço e é função dos linfocitos ou de uma substância de origem esplênica.

Sendo o baço um órgão muito rico em elementos reticulo-endoteliais, talvez êste exerça a função defensiva, também por intermédio dêstes elementos. E' sabido que êste órgão cresce em casos de leucemia e que podem os seus elementos reticulo-endoteliais dar origem a neutrofilos. Isto faz pensar que a função defensiva do baço se faz por intermédio não só de linfocitos, mas também de outras células derivadas do sistema reticulo-endotelial. E' dos elementos reticulo-endoteliais existentes na medula ossea que normalmente derivam os neutrófilos que aparecem em grande número ao redor e no interior dos inóculos do adenocarcinoma que enxertamos em camondongos resistentes.

Diante dêstes dados, pelo menos nos casos observados durante as nossas experiências, fomos levados a admitir que a falta de crescimento dos enxertos em camondongos refratários está intimamente ligada à capacidade maior com o que o sistema reticulo-endotelial dêsses animais produz uma reação leucocitária em tôrno dos fragmentos introduzidos sob a pele.

THE LEUCOCYTIC REACTION INDUCED BY GRAFTING OF AN ADENOCARCINOMA INTO A RESISTANT AND INTO A SUSCEPTIBLE STRAIN OF MICE

Abstract

This article deals with a morphological research in which the author studies microscopically the development of graftings of a transplantable adenocarcinoma into a strain of resistant mice in comparison with the development of the same tumor in a strain of susceptible ones.

In the first series of inoculations an intense reaction, almost entireley made up of polymorphonuclear leucocytes was observed around the inoculated material. This reaction occurs even before the processes of necrosis and necrobiosis had taken place. Around the material inoculated in the mice of the susceptible strain, only exceptionally a few polimorphonuclear leucocytes appeared. Based on these facts the author thinks that the defense against the growth of transplanted tumors, at least in this case, is played mainly by the polimorphonuclear leucocytes produced in the bone marrow and reaching the place of inoculation through the bloodvessels.

BIBLIOGRAFIA

1 — Brueda, B. E. — 1927 — Ueber Beziehungen der Milz zum Tumorwachstum. *Münch. Med. Wochenschrift*, 76: 1671-1672.

2 — Brueda, B. E. — 1928 — Ueber die Beeinflussung des Tumorwachstums durch die Milz. *Zeitschrift f. Krebsforsch.*, 27: 380-387.

3 — Meyer, J. R. — 1943 — Importância da origem dos camondongos para inoculações de tumores transplantaveis. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 14: 87-90.

4 — Milone — 1929 — Osservazioni istologiche intorno ai processi consecutivi all'impianto di poggetti de sarcoma in ratti albini recettivi et refrattari al tumore. *Index Analyticus Cancerologine*, Paris, 3: 8-9.

5 — Murphy, J. B. — 1914 — Source of Defense Against Heteroplastic Tissue Grafting. *J. A. M. A.*, Boston, 62: 199-201.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 9

Fig. *A* — Inóculo necrótico à esquerda, em camondongo resistente. À direita vê-se intensa reação leucocitária, 48 horas após a inoculação.

Fig. *B* — À esquerda, grupo de células neoplásicas proliferadas de um inóculo em camondongo resistente. Notar entre as células neoplásicas proliferadas e no tecido conjuntivo, à sua direita, uma forte reação leucocitária, 48 horas após a inoculação.

Fig. *C* — Aglomerado de células neoplásicas em proliferação num camondongo resistente. Notar no centro do aglomerado e a seu redor a presença de numerosos leucocitos. Enxerto feito 48 horas antes.

Fig. *D* — Parede de tecido conjuntivo ao redor de um inóculo de tumor em camondongo suscetivel. Notar a raridade de leucocitos no tecido conjuntivo. Enxerto de 48 horas.

Fig. *E* — Aglomerado de células neoplásicas proliferadas de um inóculo em camondongo suscetivel. Ao redor das células neoplásicas não ha senão raros leucocitos. Enxerto de 48 horas.

Fig. *F* — Porção periférica de um inóculo em camondongo suscetivel. À esquerda vê-se parte do inóculo necrosado, e à direita o tecido conjuntivo praticamente sem reação leucocitária. Enxerto de 48 horas.

Estampa 10

Fig. *G* — Aglomerado de células neoplásicas proliferadas de um inóculo em camondongo resistente mostrando franca reação leucocitária na parte superior. Enxerto de 48 horas.

Fig. *H* — Loja de inoculação por onde passou o inóculo neoplásico num camondongo resistente, durante o enxerto feito 48 horas antes. Notar a intensa reação leucocitária na parede da galeria.

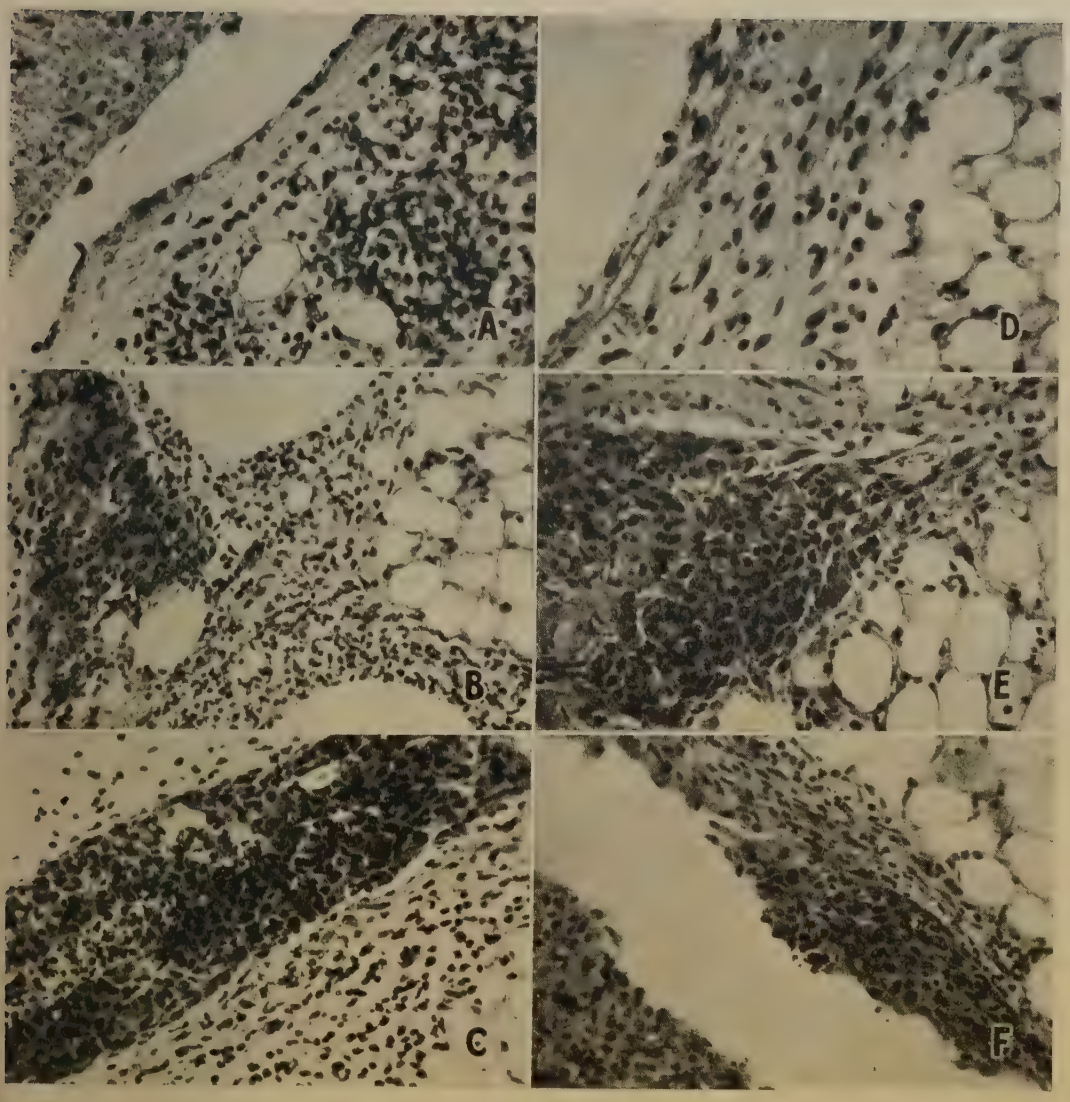
Fig. *I* — Loja de inoculação por onde passou o inóculo num camondongo resistente. À direita vê-se intensa reação leucocitária. Enxerto feito 48 horas antes.

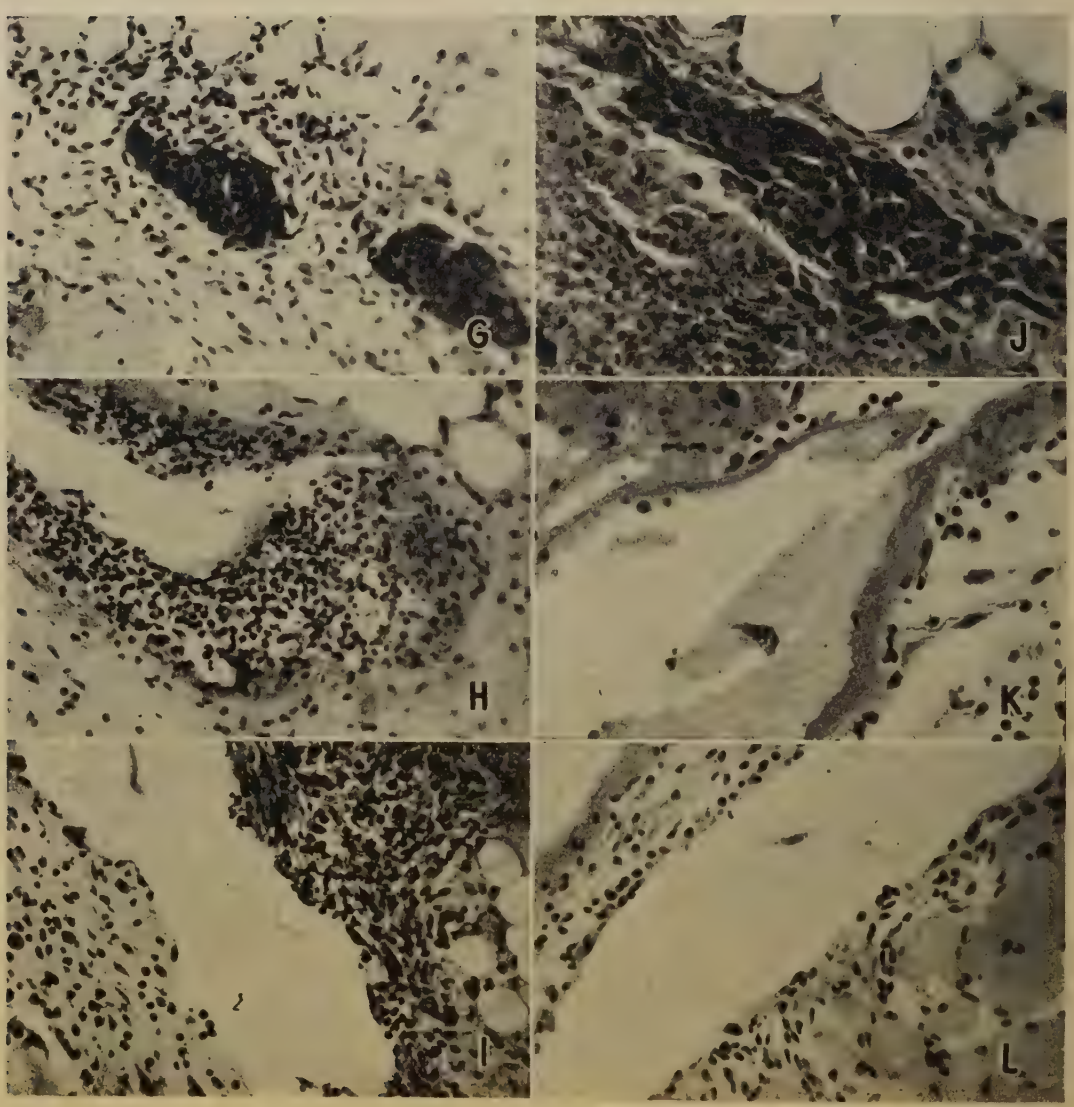
Fig. *J* — Aglomerado de proliferação neoplásica na periferia de um inóculo em camondongo suscetivel. Notar à esquerda a parte necrosada e à direita o tecido conjuntivo. Ambas sem reação leucocitária. Enxerto de 48 horas.

Fig. *K* — Loja de inoculação por onde passou inóculo neoplásico em camondongo resistente, 48 horas antes. Notar a ausência de reação leucocitária.

Fig. *L* — Outra loja em outro camondongo suscetivel, sem reação leucocitária. Enxerto feito 48 horas antes.

———o———


A
D
B
E
C
F


G
J
H
K
I
L

Vol. 14 — Art. 8 Dezembro de 1943

DIMINUIÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ENXERTOS DE ADENOCARCINOMA TRANSPLANTAVEL DE CAMONDONGO MEDIANTE LESÃO DO SISTEMA RETICULO ENDOTELIAL

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

Em trabalho anterior (5) tivemos ocasião de mostrar como um linfosarcoma transplantavel do camondongo resultava em maior número de tumores quando enxertado em camondongos previamente submetidos a "bloqueio" do S. R. E. com azul de tripan ou tinta da China. Observações idênticas foram feitas por BUENGELER, citado por DOMAGK (4) e por ANDERVONT (1-3), relativamente a outros tumores.

Sabendo que tanto os neoplasmas espontâneos como os tumores resultantes da injeção de substâncias cancerígenas não crescem quando seu transplante é feito em descendentes de certas linhagens, e dispondo de um adenocarcinoma transplantavel que se desenvolvia facilmente quando enxertado em descendentes da mesma linhagem em que êle aparecera e só excecionalmente, quando enxertado em descendentes de outra linhagem criada separadamente, realizámos uma série de experiências com o fim de verificar se, por meio de injeções que prejudicassem a atividade de S. R. E., seria possível diminuir a resistência oferecida ao crescimento dos enxertos pelos representantes da linhagem em que êles não se desenvolviam em condições ordinárias.

Método: — Tendo verificado que a tinta da China da marca "Pelikan", diluida em proporções variaveis entre 1 por 5 e 1 por 10 em líquido de Tyrode, é bem tolerada em injeções subcutâneas e peritonais, foi essa a substância que preferimos para o "bloqueio" do S. R. E. dos camondongos. As injeções eram feitas em doses variaveis de 0,2 a 1 cc. em dias alternados, até que os animais ficassem com o tecido subcutâneo francamente corado. Ocasionalmente faziamos também as injeções numa das veias da cauda. As injeções eram feitas em grupos de 10 camondongos da linhagem resistente (criação P. Bueno), e quando os camondongos pareciam já ter recebido uma dose suficiente do corante (duas a 10 injeções), eram enxertados com fragmentos de adenocarcinoma no tecido subcutâneo da região axilar direita. Fragmentos dos mesmos tumores usados para cada inoculação eram enxertados em dez camondongos pertencentes à linhagem suscetivel (criação Trapp). Todos os camondongos usados para estas experiências, quer suscetiveis quer resistentes, eram machos aproximadamente da mesma idade e que haviam sido castrados cerca de quatro semanas antes. Os animais "bloqueados" em algumas experiências continuavam recebendo novas injeções de tinta da China. Os resul-

tados eram observados periodicamente e registrados na terceira semana após os transplantes. Nos casos negativos as observações continuaram a ser feitas durante três mêses, não se tendo verificado nenhum caso de desenvolvimento tumoral tardio.

Uma primeira experiência, feita de acôrdo com o método descrito, consistiu no seguinte:

Inoculação n.º 732: — Dez camondongos da criação resistente (P. Bueno), recebem 5 injeções prévias de tinta da China diluida ao quinto, no tecido subcutâneo, no peritônio e na veia. Morrem dois camondongos após a quinta injeção. Os 8 camondongos restantes são enxertados com fragmentos do chamado tumor Trapp n.º 2, o qual na mesma ocasião fornece fragmentos para enxertos em 10 camondongos suscetiveis (Trapp). Duas novas injeções de tinta da China são feitas nos camondongos resistentes. Morre mais um camondongo injetado, 4 dias depois do enxerto. Na terceira semana após o transplante os resultados são os seguintes:

Nos 7 camondongos resistentes, "bloqueados" — 3 tumores.
Nos 10 camondongos suscetiveis não "bloqueados" — 6 tumores.

Como se vê, houve uma diminuição de resistência, si considerarmos que os camondongos sem "bloqueio" da linhagem resistente apenas em casos excecionais e isso mesmo coincidindo com possíveis lesões do S. R. E. apresentam tumores quando enxertados (3,7%). Repetindo a inoculação anterior, de acôrdo com os detalhes referidos, fizemos mais esta prova:

Inoculação n.º 736: — Dez camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) recebem 1,3 cc. de tinta da China diluida ao decimo, em cinco dias alternados. Em seguida à quinta injeção êsses camondongos são enxertados com fragmentos do chamado tumor Trapp n.º 1, que também é um adenocarcinoma só transplantavel aos descendentes da linhagem suscetivel (Trapp). Ao mesmo tempo são enxertados 10 camondongos da linhagem suscetivel, com fragmentos do mesmo tumor. Três semanas mais tarde notam-se os seguintes resultados:

Nos 10 camondongos "bloqueados" da linhagem resistente — 1 tumor.
Nos 10 camondongos não "bloqueados" da linhagem suscetivel — 8 tumores.

Podemos admitir que o menor número de tumores que se desenvolveram entre os animais bloqueados, em relação ao que se observou na experiência anterior, se explique pela dose menor de corante, empregada nesta experiência.

Aumentado a quantidade de tinta da China, fizemos a seguinte experiência:

Inoculação n.º 740: — Dez camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) recebem 2 cc. de tinta da China diluida ao quinto, em 4 dias alternados. A seguir são êsses animais enxertados com fragmentos do tumor Trapp n.º 1. Na mesma ocasião são enxertados 10 camondongos da linhagem suscetivel (Trapp) com fragmentos do mesmo tumor usado para as inoculações do grupo resistente. Morrem dois camondongos, um dia depois da inoculação do tumor, no grupo bloqueado. Os resultados são os seguintes:

Nos 8 sobreviventes e resistentes "bloqueados" — 1 tumor.
Nos 10 camondongos suscetiveis, não "bloqueados" — 5 tumores.

Pelos resultados obtidos fica mais uma vez evidenciada a possibilidade de se vencer a resistência ao desenvolvimento dos enxertos do adenocarcinoma de S. Paulo, mediante "bloqueio" do S. R. E. dos camondongos da linhagem resistente.

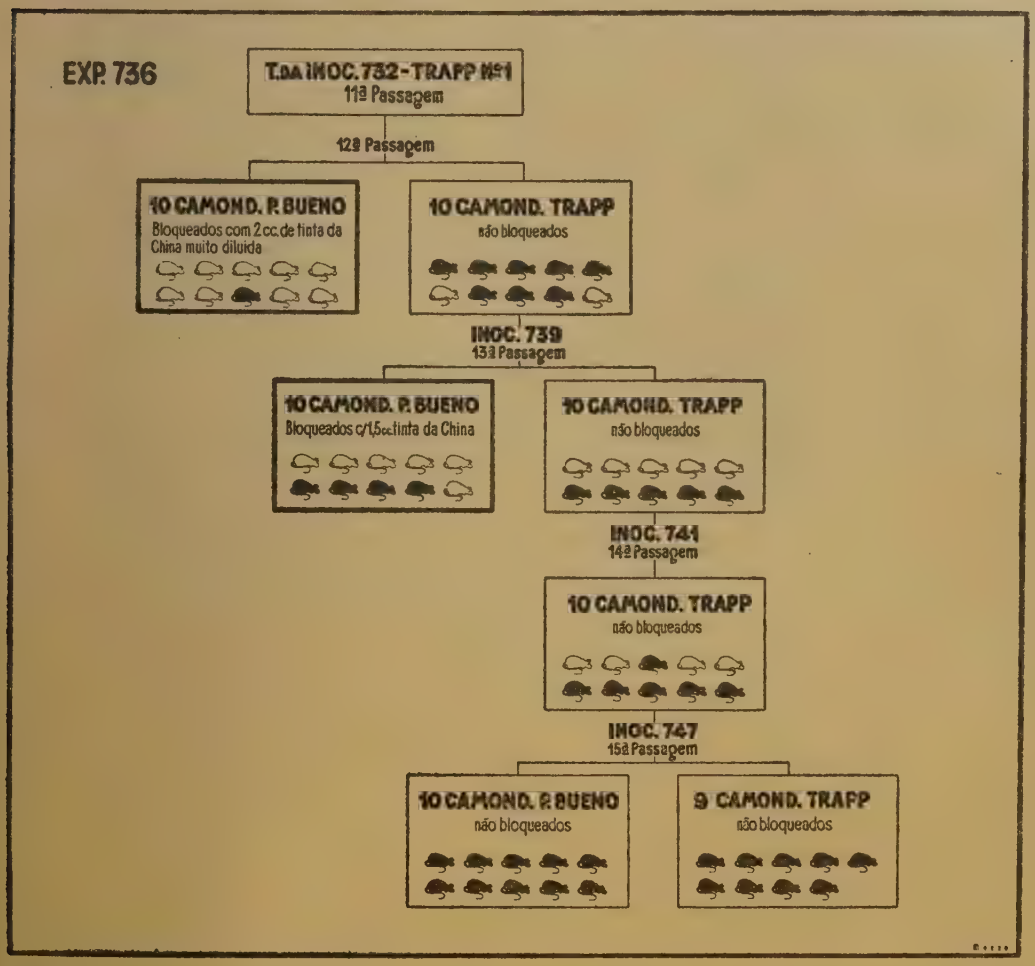


Fig. 1 — Diagrama mostrando diversas passagens em série com os respectivos resultados. As figuras de camondongos em silhueta escura representam os animais em que as inoculações resultaram no desenvolvimento de tumores. Pelo diagrama se vê que na 15.ª passagem, mesmo sem bloqueio os camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) permitiram o desenvolvimento de tumores, como os camondongos da linhagem suscetivel (Trapp).

Tendo em vista a possibilidade de uma proliferação dos elementos do S. R. E. que não ficavam impedidos de se multiplicar após as injeções da tinta da China, fizemos, na inoculação seguinte, injeções de doses massiças do corante, logo depois de enxertados os fragmentos de tumor. Os resultados dessa modalidade de "bloqueio" e transplante de tecido tumoral foram os seguintes:

774

Inoculação n.º 742: — Dez camondongos da linhagem resistente (P. Bueno), recebem fragmentos de tumor Trapp n.º 1, desenvolvido em camondongos dessa mesma linhagem, após "bloqueio" (Exp. 740). Logo após o transplante os camondongos recebem 1 cc. de tinta da China a 1 por 5, sob a pele e no peritôneo. Na mesma ocasião são enxertados com fragmentos do mesmo tumor 10 camondongos da linhagem suscetivel (Trapp). Três semanas mais tarde são registrados os seguintes tumores:

Nos 10 camondongos resistentes e "bloqueados" — 7 tumores.
Nos 10 camondongos suscetiveis, não "bloqueados" — 7 tumores.

Os resultados obtidos são comparaveis aos anteriores, mostrando que foi possível vencer a resistência dos camondongos do primeiro grupo. O número maior de tumores que se desenvolveu entre os resistentes pode ser interpretado como resultante de uma adatação do tecido tumoral ao terreno oferecido por êstes hospedeiros, pois o tumor usado nesta passagem se desenvolveu num camondongo resistente que fôra "bloqueado". A verificação foi feita de novo com um tumor desenvolvido em representante da linhagem suscetivel; êste tumor foi transplantado em camondongos "bloqueados" e não "bloqueados" da linhagem resistente, como adiante se vê:

Inoculação n.º 743: — Dez camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) recebem fragmentos de um tumor desenvolvido em camondongo da linhagem resistente (isto é, da inoculação 742). Logo depois, os dez camondongos enxertados recebem 1 cc. de tinta da China a 1 por 5, sob a pele e no peritôneo. Com fragmentos do mesmo tumor usado para o grupo referido são enxertados mais 10 camondongos da mesma linhagem resistente, sem concomitante injeção de tinta da China. Morre um dos camondongos "bloqueados" dentro das primeiras 24 horas. Dentro de três semanas desenvolvem-se os seguintes tumores:

Nos 9 camondongos resistentes "bloqueados" — 8 tumores.
Nos 10 camondongos resistentes não "bloqueados" — 9 tumores.

Infere-se dos resultados obtidos que praticamente não houve diferença entre os "bloqueados" e não "bloqueados". Êsse fato coincide com duas passagens do material usado atravez dos camondongos resistentes (Inoculação 740 e 742), no decurso dos transplantes seriados anteriores. Esta coincidência sugere a possibilidade de uma "adatação" ainda maior do tumor à linhagem resistente.

Para completar estas observações fizemos a seguinte prova visando apreciar o comportamento de enxertos de tumor com uma só passagem em representantes da linhagem resistente:

Inoculação n.º 744: — Dez camondongos da linhagem resistente são enxertados com pedaços de tumor desenvolvido na linhagem suscetivel (inoculação 742) depois de ter passado uma vez pela linhagem resistente. Na mesma ocasião 10 camondongos da linhagem suscetivel recebem fragmentos do mesmo tumor. Os resultados que se registram dentro das três semanas depois dos enxertos são êstes:

Nos 10 camondongos resistentes, sem "bloqueio" — 2 tumores.
Nos 10 camondongos suscetiveis — 10 tumores.

Os dados registrados parecem confirmar a possibilidade da acentuada adatação do tumor à linhagem que anteriormente era resistente.

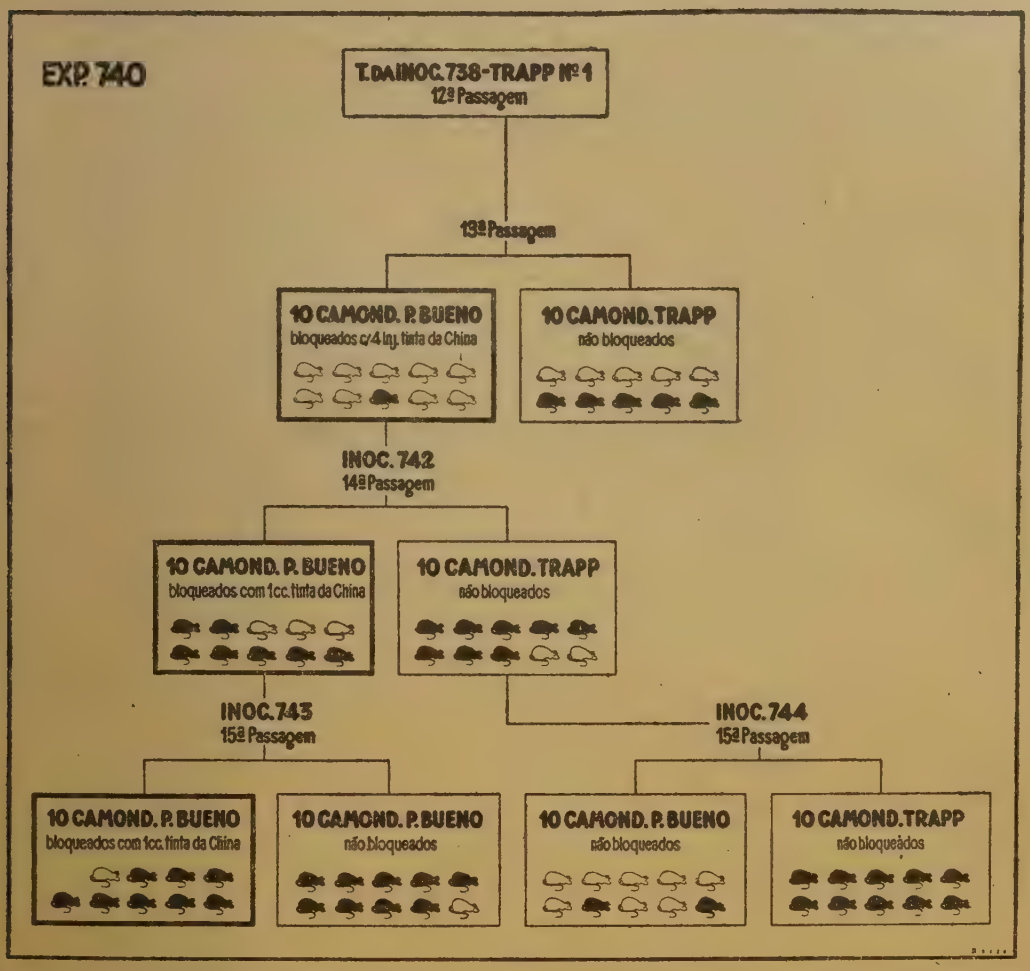


Fig. 2 — Diagrama mostrando que o crescimento do tumor em camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) que não foram bloqueados, nas inoculações 743 e 744 coincide não somente com o fato do material inoculado haver passado previamente em hospedeiros dessa linhagem (inoculação 738 e inoculação 742), mas também com o fato do material estar na 15.ª passagem em série, como na figura 1.

Com a prova seguinte tivemos em vista saber qual o resultado dos enxertos de um tumor que não tinha anteriormente passado em representantes de linhagem resistente, quando os mesmos enxertos eram feitos em representantes não "bloqueados" da linhagem resistente.

Inoculação n.º 747: — Dez camondongos da linhagem resistente (P. Bueno) e 10 camondongos da linhagem suscetivel (Trapp) são enxertados com

fragmentos de um tumor da linhagem suscetivel o qual anteriormente não havia passado pela linhagem resistente. Morrem dois camondongos do grupo suscetivel nos dois dias que se seguiram ao transplante do tumor. Os resultados entre os sobreviventes são os seguintes:

Em 10 camondongos resistentes — 10 tumores.
Em 9 sobreviventes suscetiveis — 9 tumores.

Êstes números corroboram a possibilidade lembrada, isto é, de uma "adatação" do tecido tumoral em representantes da linhagem que anteriormente se mostrava resistente, sem que fôsse necessário injetar previamente a tinta da China.

Poder-se-ia admitir, neste caso, um fenômeno de "adatação" semelhante ao que tem sido observado por outros autores, com outros tumores.

Uma pergunta natural que surge diante dêstes dados diz respeito ao mecanismo da "adatação". Considerando-se o que se sabe em relação ao papel do S. R. E. em casos de tumores espontâneos e em casos de tumores experimentais, pode-se supôr que a "adatação" dos tumores às linhagens resistentes e que se observa no fim de certo número de passagens em série seja resultado de um decrescimo da atividade do S. R. E. consequente a lesões dos elementos dêsse aparelho de defesa. VOLTERRA (10), estudando o assunto, demonstrou que a imunidade contra tumores transplantaveis coincide com reação intensa dos elementos do S. R. E. DOROTHY PARSONS (9), pesquizando os gânglios linfáticos de camondongos irradiados, injetados com substâncias cancerígenas ou com tumores transplantaveis e gânglios de camondongos com tumores espontâneos, descreveu alterações profundas nos elementos reticuloendoteliais dêsses órgãos, mesmo antes de se notar o desenvolvimento de tumores provocados pelas irradiações ou por injeções de dibenzoantraceno.

Em trabalhos feitos anteriormente (7-8) conseguimos mostrar que os inóculos de um adenocarcinoma transplantavel, quando enxertados em camondongos de uma linhagem resistente, eram sempre cercados de uma forte reação leucocitária em sua periferia, ao contrário do que se observa com enxertos do mesmo adenocarcinoma em camondongos suscetiveis. Sabemos atualmente que os leucocitos são elementos derivados do S. R. E. e é muito possível que estas células desempenhem pelo menos certo papel no mecanismo de defesa desenvolvido por êste sistema contra o desenvolvimento dos tumores transplantados.

Tais observações, se não provam, pelo menos evidenciam o fato de uma coincidência constante entre o desenvolvimento de um tumor maligno e uma lesão no S. R. E. Diante dêsses dados, é admissivel a possibilidade de que a "adatação" seja o resultado da penetração na

corrente circulatória de substâncias que se formam em maior quantidade nos tumores que já passaram por certo número de transplantações em série.

Essas substâncias, assim produzidas em quantidade suficiente, iriam, como a tinta da China, azul de Trypan e outros corantes usados no "bloqueio", lesar as células do S. R. E., prejudicando a defesa que tais elementos exercem contra o desenvolvimento dos neoplasmas inoculados.

ON THE DECREASE OF THE RESISTENCE AGAINST TRANSPLANTABLE TUMORS, FOLLOWING INJURIES OF THE RETICULO-ENDOTHELIAL APPARATUS

Abstract

This paper deals with a number of experiments the results of which led the author to confirm the fact that the reticulo-endothelial apparatus plays an important part in the defense of the organism against the growth of transplanted tumors. The experiments consisted in the innoculation of two anenocarcinomas of mice into a pure strain of susceptible animals and in a pure strain of resistent animals which were previously injected with China ink.

The numbers of tumors developed in each group were carefully observed and compared. During the ten first serial passages in the mice of the resistent strain, the innoculations of the tumor tissues only resulted in the development of tumors when China ink was used. After the fourteenth serial passage the growth of the tumors could be constantly obtained, even without the use of China ink.

Based on a number of observations, the author suggests the possibility of the increase of the growth capacity of the transplanted tumors, as it is frequently observed in the course of serial passages, to be the result of injuries caused on the reticulo-endothelial apparatus by substances formed in the tumor and entering into the circulation, thus interfering with the protective function of that system.

BIBLIOGRAFIA

1 — ANDERVONT, H. B. — 1930 — Studies on immunity induced by mouse sarcoma 180. *Public Health Reports*, Washington, 47: 1859-1877.

2 — ANDERVONT, H. B. — 1934 — The use of pure strain animals in studies on resistance to transplantable tumors. *Public Health Reports*, Washington, 49: 60-65.

3 — ANDERVONT, H. B. — 1934 — The production of dibenzanthracene tumors in pure strain mice. *Public Health Reports*, Washington, 49: 620-625.

4 — DOMAGK — 1930 — De la cancerologia experimental. *Rev. Med. Germano Ibero Americana*, Leipzig, 3: 611-625.

5 — MEYER, J. R. — 1930 — Influência do bloqueio do sistema reticulo-endothelial sôbre o desenvolvimento do lymphosarcoma transplantavel do camondongo. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 3: 177-180.

6 — MEYER, J. R. — 1931 — A propósito da ação das globulinas sôbre o desenvolvimento do lymphosarcoma transplantavel do camondongo. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 4: 285-290.

7 — MEYER, J. R. — 1943 — Importância da origem dos camondongos usados para inoculações de tumores transplantaveis. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 14: 87-90.

8 — MEYER, J. R. — 1943 — A reação leucocitária provocada por enxertos de adenocarcinoma em camondongos de linhagens resistente e suscetivel ao tumor. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 14: 91-96.

9 — PARSON, L. D. — 1939 — Changes in the lymphglands of tumor bearing mice. *Jour. Path. and Bacteriol.*, London, 47: 501-523.

10 — VOLTERRA, M. — 1932 — Die morphologischen Merkmale der Geschwulstimmunitaet. *Zeitschrift f. Krebsforschung*, Berlin, 35: 315-330.

Vol. 14 — Art. 9 Dezembro de 1943

ESTUDOS SOBRE A TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS

POR

K. Silberschmidt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 11-17

Entre a vegetação dos campos dos arredores da Capital do Estado de São Paulo, os representantes da família das malváceas ocupam um lugar de destaque. Encontramos principalmente, em grande abundância, hervas e pequenos arbustos pertencentes aos gêneros *Pavonia* e *Sida*. Justamente os representantes dêste último gênero chamam a atenção, mesmo de um observador superficial, devido à uma clorose acentuada e ornamental que as folhas de muitos exemplares exibem. Manifesta-se essa clorose por manchas angulares, de tonalidade verde ou amarela, que se localizam de preferência nas áreas do limbo demarcadas pelas nervuras secundárias.

Em geral, as manchas claras são bem separadas das áreas escuras formando frequentemente desenhos angulares. A tonalidade clara pode variar, nas folhas de diversos indivíduos, de um amarelo-creme, quasi branco, até um verde carregado, apenas ligeiramente mais claro do que o verde normal das folhas. Até dentro da mesma mancha de uma folha pode haver diversas tonalidades de côr, que passam, quasi imperceptivelmente, de um matiz mais claro no centro, para um mais escuro no bordo da mancha.

Já essa variação da tonalidade das manchas está em contradição com a hipótese de que a "clorose" evidenciada pelas plantas de *Sida* possa ser de caráter hereditário, quer dizer, o resultado da ação de um "gen" na distribuição de clorofila nas folhas. Com efeito, as experiências que vamos relatar a seguir demonstraram que a anomalia da coloração das folhas de numerosas plantas do gênero *Sida* é provocada por um agente causador de uma doença infecciosa do grupo das doenças de virus, a chamada "clorose infecciosa". E' pois com razão que as formas cloróticas de *Sida* não foram consideradas, na literatura sistemática referente a êste gênero, como espécies ou variedades distintas. Ao contrário, a valiosa descrição monográfica do gênero *Sida*, da autoria de H. DA C. MONTEIRO FILHO (15,1936) nem menção faz dessas formas.

Acreditamos, por várias razões, que esta doença devia merecer um estudo mais apurado. Em primeiro lugar, consideramos a enorme

frequência de plantas doentes nos nossos campos, que podem eventualmente constituir perigosos fócos de infecção para os representantes da família das malváceas que são de importância econômica, tais como o algodão, o quiabeiro, as guaximas texteis *(Urena lobata)*, os *hibiscus*, etc. Em segundo lugar, achamos de interêsse tentar esclarecer alguns problemas referentes à etiologia da "clorose infecciosa", que estão ainda bastante obscuros, não obstante o grande número de pesquisas que, especialmente na Europa, e também nos Estados Unidos, têm sido dedicado ao estudo dessa doença. Assim realizamos várias séries de observações sôbre a transmissão natural e experimental da doença e sôbre os seus efeitos fisiológicos. No atual trabalho quizemos apresentar os dados referentes à transmissão experimental do virus da doença por suco e por enxertia, reservando a comunicação de observações sôbre a sua disseminação natural para uma publicação ulterior.

O autor agradece a valiosa colaboração que lhe foi prestada na execução de grande número de ensáios experimentais, pelos agrônomos Manoel Alves de Oliveira, São Gonçalo, Paraíba e Lycio de Castro Vellozo, Paraná, durante o estágio dêsses técnicos na Secção de Fisiologia Vegetal.

LITERATURA

Ante a abundante literatura relativa à "clorose infecciosa" das malváceas, não achamos conveniente relatar, um por um, os trabalhos realizados sôbre o assunto. Preferimos por isso expôr aqui os problemas principais que as pesquisas abordaram, esclarecendo para cada assunto, o mais possível, o estado atual do conhecimento a respeito.

Desde o início das pesquisas sôbre a "clorose infecciosa" das malváceas, despertou grande interêsse o problema da transmissibilidade do virus da doença por meio de suco.

Apesar do emprêgo das mais variadas técnicas de transmissão por suco, nem E. Baur (1, 2, 3; 1904, 1906) nem H. Lindemuth (14, 1907) nem, entre os autores mais recentes, W. Hertzsch (6, 1928) e H. Klebahn (11, 1932) obtiveram resultados positivos de transmissão mecânica. Deve-se porém frizar que todos êsses autores trabalharam com a "clorose infecciosa" de *Abutilon*, e não incluiram nos seus estudos as nossas duas espécies de *Sida*.

Mais promissores, por outro lado, são os resultados de estudos efetuados por vários autores a respeito da transmissão da "clorose infecciosa" pelas sementes.

E' verdade que pelo menos quanto à transmissibilidade por sementes, da clorose "A", W. Hertzsch (6, 1928) afirmou, que essa doença não se propaga por essa via. Também M. T. Cook (4, 1931)

não pôde observar essa transmissibilidade para a "clorose infecciosa" de *Abutilon hirtum* (LAM.) SWEET, espécie esta selvagem em Porto Rico. Por outro lado, já H. LINDEMUTH (14, 1907) tinha verificado que algumas sementes de *Lavatera arborea* L., infeccionada com o virus de *Abutilon Thompsonii* deram origem à plantas que mais tarde apresentavam folhas cloróticas. Também sementes da variedade "H. Cannell" de *Abutilon Thompsonii* foram verificadas como capazes de transmitir a doença. Essas observações de LINDEMUTH foram recentemente confirmadas pelos resultados dos trabalhos de J. Y. KEUR (8, 9, 1933 e 1934). Êste autor obteve nos seus ensáios 461 plantas doentes em um total de 3.185 pés desenvolvidos de sementes que resultaram de cruzamentos interclonais de *Abutilon*. Demonstrou êle que a clorose que se manifesta em algumas plantas das sementeiras de *Abutilon*, é transmissivel por enxertia à plantas verdes do mesmo gênero. Finalmente deve-se mencionar aqui também o trabalho de S. IKENO (7, 1936), apezar de abranger apenas resultados de estudos sôbre uma "clorose infecciosa" de *Capsicum annuum*. Êste autor verificou primeiro a passagem, por enxertia, da doença por êle estudada, e excluiu dessa maneira a possibilidade de que o mal encontrado por êle pudesse ser provocado por fatores genéticos. Depois demonstrou que a doença se propaga por sementes à totalidade (100%!) da descendência.

Êsses resultados, apezar de não se referirem à transmissão da doença por sementes, nos gêneros de malváceas entre nós disseminados, não deixam de apoiar fortemente a idéia, de que esta maneira da transmissão da doença na família das malváceas deve ser levada em consideração.

Passando agora a relatar os principais resultados dos diversos autores no que diz a respeito à transmissão da "clorose infecciosa" das malváceas por enxertia, deve-se mencionar que já E. MORREN (16, 1896), H. LINDEMUTH (14, 1878-1907) e E. BAUR (1-3, 1904-1906), isto é, os primeiros autores que se ocuparam com o estudo do clorose de *Abutilon Thompsonii*, espécie então recentemente importada na Europa, verificaram a transmissibilidade do virus por enxertia não só para outros representantes do gênero *Abutilon*, mas também para outros gêneros de malváceas. De interêsse especial para o nosso problema é uma nota preliminar de L. O. KUNKEL (13, 1930) que informa, embora sem entrar em detalhes de experimentação, quanto aos resultados positivos da transmissão da "clorose infecciosa" — chamada por êle mosaico — de *Sida*, por meio de enxertia.

Já por ocasião dos primeiros estudos foi averiguada a ocorrência de grandes diferenças de suscetibilidade à êste virus entre os

vários gêneros e espécies examinadas. A-fim-de tornar bem patentes essas diferenças, E. F. DAVIS (5, 1929) reuniu, sob forma de uma tabela, os resultados positivos de todos os ensáios de transmissão, por enxertia, conseguidos pelos autores anteriores, indicando para cada espécie o gráo de suscetibilidade ao virus. Dessa tabela de DAVIS pode-se, por exemplo, verificar que *Abutilon Sellowianum* REGEL e *Abutilon Avicennae* G. são altamente suscetiveis, ao passo que as espécies *Abutilon arboreum* SWEET e *Abutilon insigne* apenas dificilmente podem ser infeccionadas, e exibem, mesmo assim, sintomas duvidosos. Considerando essas observações e os resultados correspondentes de H. KLEBAHN (11, 1931), não se pode duvidar, então, que alguns gêneros de malváceas e até certas espécies do gênero *Abutilon* possuem um alto gráo de resistência ao virus da "clorose infecciosa".

Estreitamente relacionada com êste problema está a questão, aventada e apoiada por E. BAUR (1, 1904), de se também p a r t e s de uma planta aliás suscetivel, podem ser dotadas de uma tal resistência. E. BAUR foi levado a essa idéia pela observação de que frequentemente um ou outro ramo lateral de plantas nitidamente doentes deixa de exibir sintomas da doença. Mas já H. KLEBAHN (11, 1931), defendeu a opinião de que a ausência de sintomas em certos ramos laterais não é consequência de uma proteção especial devido à imunidade, mas sim à um desvio do transporte do virus, na planta, que nesses casos não atinge os respectivos ramos. Segundo essa idéia, tratar-se-ia, nesse caso, antes de um problema de condução do virus do que de uma questão de resistência a êle. Esta opinião de KLEBAHN recebeu decisiva confirmação em seguida aos estudos de J. Y. KEUR (10, 1934). Êste autor conseguiu destacar tais ramos laterais, que tinham escapado à infecção, das plantas doentes, e cultiva-las por estaquia. Essas estacas tornaram-se doentes e emitiram folhas tipicamente cloróticas após estarem enxertadas com brotos de plantas doentes. Isso mostra que, de fato, em plantas infeccionadas, todos os ramos são suscetiveis ao virus, mas nem todos são atingidos por êle.

Menos fácil é a solução de outro problema que surgiu após a demonstração da ocorrência de diversos gráus de suscetibilidade ao virus da "clorose infecciosa" entre as múltiplas espécies de malváceas.

E' a questão de ser o agente causador da "clorose infecciosa" de todas as malváceas o mesmo virus, ou se diversos virus ou pelo menos diversas variantes do mesmo virus são responsáveis pela doença. Baseado em experiências de transmissão, interespecífica e intergenérica da "clorose infecciosa" por enxertia, W. HERTZSCH (6, 1928) chegou à conclusão de que existem dois tipos de "clorose infecciosa", que atacam as malváceas. Também J. Y. KEUR, foi levado por suas expe-

riências à distinguir pelo menos duas variantes do virus da "clorose infecciosa", e isso só no gênero *Abutilon*. Já que êsses autores, trabalhando com um número relativamente reduzido de espécies e em países distantes do centro da disseminação natural dos principais gêneros suscetíveis das malváceas, conseguiram a distinção de vários tipos de "clorose infecciosa", acho bem possível que um estudo minucioso em condições naturais ainda mais favoráveis demonstre a existência de um número muito mais elevado de variantes.

Isso nos leva à um dos problemas principais do presente trabalho, isto é, à questão da identidade do virus da "clorose infecciosa" de *Abutilon* ao virus encerrado pelas hervas daninhas tão frequentes no Estado de São Paulo, a saber *Sida rhombifolia* e *Sida acuta* var. *carpinifolia*. A "clorose infecciosa" de *Abutilon* já foi, como se pode inferir do nosso apanhado da literatura (3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 21), objeto de muitas observações e estudos. Por outro lado, há na literatura apenas indicações muito escassas sôbre a "clorose infecciosa" das espécies de *Sida*, escolhidas para êste nosso estudo. M. T. Cook (4, 1931), relatando apenas a ocorrência da "clorose infecciosa" de *Sida* em Porto Rico, conjectura que o agente causador da doença talvez seja o que também é responsável pela doença correspondente de *Abutilon*. Também L. O. Kunkel (13, 1930), na nota preliminar já mencionada, considera a doença de *Sida* muito semelhante à de *Abutilon*, sem apresentar, porém, argumentos experimentais a favor dessa hipótese. Diante, pois, do fato, de que os poucos trabalhos que se referem na realidade à doença de *Sida*, não visaram uma exata comparação dessa doença com a de *Abutilon*, a questão da identidade entre os agentes causadores das doenças correspondentes de *Sida* e *Abutilon* deve ser considerada ainda em aberto.

Depois de termos enumerado uma série de problemas relacionados com a transmissão, por enxertia, da "clorose infecciosa" das malváceas, resta-nos ainda mencionar as tentativas de transmissão da doença por enxertias incompletas. Já foi mencionado que, até agora, todas as tentativas de transmitir a doença por suco frustaram. Seria pois de grande interêsse verificar se pelo menos há indicações na literatura, que demonstrem que talvez um contáto relativamente superficial e de pouca duração, entre enxerto e cavalo, seja suficiente para a transmissão da doença. Outro problema interessante consistiria em averiguar se pequenas placas tiradas da casca de plantas doentes, e implantadas na casca de pés sadios, têm a capacidade de provocar a doença no cavalo.

O primeiro dêstes problemas, isto é, a influência do gráu de pegamento entre o enxerto e o cavalo sôbre a transmissão da "clorose

infecciosa" das malváceas foi estudado detalhadamente por H. KLEBAHN (11, 1932). Êste autor pretendeu examinar a veracidade das indicações de autores anteriores que afirmavam não haver passagem da doença do componente doente para o componente sadio, de uma enxertia, se faltasse um bom pegamento entre enxerto e cavalo. Assim, KLEBAHN efetuou experiências de encostia com pares de pés de *Abutilon striatum* e *Abutilon Thompsonii* plantados no mesmo vaso. De 6 em 6 dias, as hastes enxertadas foram separadas, os cortes renovados e as plantas novamente encostadas foram amarradas para mais um período de 6 dias. De fato, no curso dessas experiências, observava-se a passagem da doença da planta doente para a sadia. O próprio autor admitia que o período de contáto de 6 dias era bastante, para permitir aos componentes da enxertia a formação de "callus"; negava, porém, que se tivesse efetuado um verdadeiro pegamento entre o enxerto e o cavalo.

Num segundo trabalho H. KLEBAHN (12, 1936) tentou provocar uma transmissão do virus da "clorose infecciosa" de *Abutilon* deixando enxerto e cavalo em contáto por um período de 6 dias sómente. Estas experiências, porém, não deram resultados positivos.

Para nós, os casos positivos de transmissão conseguidos por KLEBAHN no seu primeiro trabalho apenas provam que o agente causador da "clorose infecciosa" não necessita de vasos condutores para passar de uma planta para outra. Já células parenquimáticas não diferenciadas, mesmo estando ainda em ligação recente e fraca, podem servir de ponte para a passagem do virus.

Devemos agora abordar ainda o segundo dos problemas antes mencionados, isto é, o de se pedaços de casca de plantas doentes, não munidos de folhas, são capazes de transmitir a doença. Infelizmente não dispomos, a êste respeito, de indicações muito abundantes de literatura. E. F. DAVIS relata os resultados de experiências de E. BAUR, que consistiram na execução de enxertias de brotos normais de *Abutilon arboreum* sôbre cavalos desfolhados de *Abutilon Thompsonii*. Nessas experiências a "clorose infecciosa" passou para os enxertos só depois do desenvolvimento, nos cavalos, de novas folhas doentes. Parece, conforme êsses e outros ensáios semelhantes, que o virus se acumula principalmente nas folhas, existindo, porém, em pequenas quantidades, também em outros órgãos. Com relação ao mesmo assunto é de interêsse um trabalho de H. LINDEMUTH (1907 citado por E. F. DAVIS) que prova que o virus pode ser transportado até através de raizes. LINDEMUTH enxertou, nestes ensáios, raizes de plantas sadias de *Althaea rosea* sôbre hastes de plantas cloróticas de *Abutilon Thompsonii*. Em alguns casos observou-se a passagem da doença para as plantas antes sadias de *Althaea*.

Com isso vamos encerrar a exposição das múltiplas questões que se relacionam com o problema de transmissão da "clorose infecciosa" por enxertia. Na parte dêste trabalho que trata da apresentação dos dados dos nossos próprios ensáios, algumas destas idéias serão discutidas mais detalhadamente.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE ALGUNS ENSAIOS EXPERIMENTAIS

1 A) A PASSAGEM DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS POR MEIO DE SUCO

A-pezar-dos resultados francamente negativos que os autores anteriores tinham conseguido nas tentativas de transmitir o virus da "clorose infecciosa" por suco, procuramos novamente resolver êsse problema, modificando ligeiramente a técnica. Damos a seguir, em ordem cronológica, os dados dêsses ensáios.

1) A primeira série de ensáios, que serviu para fins de orientação, foi executada em fins de Janeiro de 1942 com material doente pertencente à espécie *Sida acuta* BURM. var. *carpinifolia* (L.). K. SCHUM. As inoculações foram executadas não só em plantas sadias da mesma espécie, mas também em séries de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. "Mulatinho" e de *Nicotiana glutinosa*.

Quanto à técnica empregada, fizemos uso de 5 métodos diferentes:

a) no primeiro ensáio preparamos o suco a partir de folhas inteiras de plantas doentes, em almofariz esterilisado; o suco diluido com água distilada na proporção de 1 para 3, foi posto sôbre as folhas com pipetas capilares e distribuido sôbre o limbo das folhas com o polegar desinfetado;

b) no segundo ensáio aplicamos o suco da maneira já descrita no item *a*, preparando-o, porém, apenas a partir das áreas claras das folhas doentes, que tinham sido cortadas cuidadosamente, com uma tesoura esterilisada;

c) no terceiro ensáio, justapuzemos a folha a ser inoculada com a folha doente e perfuramos ambas com agulha esterilisada;

d) no quarto ensáio distribuimos gôtas de suco, preparado antes no almofariz, sôbre as folhas sadias, lesando em seguida as folhas através dessas gôtas, com agulha esterilisada;

e) no quinto ensáio, finalmente, preparamos o suco da maneira descrita no item *b*, mantendo porém o almofariz durante toda a operação, numa vasilha contendo gêlo, para evitar uma eventual inativação do virus devido à temperatura ambiente.

Em nenhuma das plantas inoculadas por qualquer um dêstes processos pudemos verificar o aparecimento de sintomas da "clorose infecciosa". Portanto todos êsses ensáios deram resultados negativos.

2) Uma segunda série de ensáios de inoculações por suco, levada à efeito em 7-8-42, foi realizada com plantas da espécie *Sida rhombifolia.*

Organisamos esta série de experiências, baseando-nos na hipótese de que talvez o virus da "clorose infecciosa" só num determinado pH possa se manter ativo, fóra do organismo.

Para averiguar se essa hipótese correspondia à realidade, preparamos — seguindo neste ensáio em parte a técnica descrita por A. F. Ross (19, 1941) — tampões, obtidos por misturas de 0,15 N soluções de monofosfato de sódio e de bifosfato de potássio. Os tampões preparados conforme P. Rona (18, 1931, p. 64) foram verificados (por meio de um aparelho eletrométrico, "Coleman") como dotados de um pH de 5,8; 6,9; e 7,7 respectivamente. Cada um dêsses tampões serviu para a preparação de um suco de folhas sadias e doentes de *Sida rhombifolia;* esta preparação foi efetuada de acôrdo com o processo seguinte: trituravam-se, em almofariz esterilisado, 5 grs. de folhas com 20 cc. do tampão; a pasta macerada ficou meia hora na geladeira e foi prensada depois através de um pedaço de etamine; o volume do suco crú, obtido desta maneira, foi medido numa proveta e depois diluido com o mesmo volume do tampão respectivo.

Sucos de folhas sadias e doentes, destinados a servir de testemunhas, foram preparados separadamente da mesma maneira, tendo sido usada apenas água distilada em lugar do tampão. Daremos a seguir os valores de pH verificados para as diferentes preparações de suco.

TABELA 1

pH dos sucos usados para inoculações, e preparados:

Com	De folhas sadias	De folhas doentes
H_2O	5,75	6,38
tampão de pH 5,8	5,70	5,75
» » 6,9	6,78	6,72
» » 7,7	7,24	7,16

Das indicações desta tabela pode-se verificar que o suco preparado de plantas sadias de *Sida rhombifolia* caracterisou-se por um pH mais baixo do que o obtido de plantas doentes. Esta observação, que foi confirmada em determinações posteriores, pode oferecer certo

interêsse para futuros estudos sôbre as qualidades bioquímicas de plantas atacadas pela "clorose infecciosa".

Também para o nosso problema, a verificação da existência de uma diferença no índice de acidez entre plantas sadias e doentes, tinha certa importância, porque, baseados nestas experiências, nutriamos a esperança de poder manter ativo o virus da "clorose infecciosa" fóra do organismo, num meio neutro ou ligeiramente ácido. Infelizmente os resultados dos nossos ensáios de inoculações por suco não corresponderam à esta expectativa.

As plantas de *Sida* escolhidas para inoculação tinham sido cultivadas de sementes provenientes de plantas sadias. A inoculação foi feita distribuindo-se com o polegar desinfetado 0,05 cc. do respectivo suco sôbre a face superior de uma folha, que tinha sido, poucos momentos antes, escarificada com agulha esterilisada.

Cada um dos 8 sucos mencionados na nossa tabela, foi inoculado separadamente em 4 plantas, de maneira que um total de 34 plantas foi submetido à êste tratamento. Nenhuma das plantas inoculadas apresentou durante as 10 semanas de observação o mais ligeiro sintoma de "clorose infecciosa".

3) Atribuindo o resultado negativo das inoculações por suco, nas duas primeiras séries de experiências, à uma possível falta de eficiência dos métodos de inoculação empregados nessas séries, efetuamos ainda mais um grupo de ensáios de inoculação por suco, seguindo desta vez uma técnica diferente. Tomando conhecimento, por um trabalho de SHIFRISS, MYERS e CHUPP (20, 1942) sôbre a resistência do pepino ao virus do mosaico, de que naquela planta hospedeira a inoculação do virus nos cotilédones deu a possibilidade de diferenciar, num processo bastante rápido, as plantas suscetiveis e as resistentes, resolvemos tentar, também em *Sida*, a inoculação das folhas cotiledonares com o virus da "clorose infecciosa". Ensáios neste sentido foram executados em 11 e 14 de Junho de 1942. Na primeira série dêstes ensáios esmagámos com as mãos folhas doentes de *Sida rhombifolia* e passamos, por meio de uma pinça, o tecido dilacerado sôbre as folhas cotiledonares de 10 plantas sadias de *Sida rhombifolia*, antes polvilhadas com carborundum. Na segunda série dêstes ensáios usamos de um outro processo: sobrepuzemos à folhas cotiledonares das plantinhas sadias uma folha bem doente, que atravessamos 10 vezes com um micro-alfinete entomológico, para atingir diferentes pontos das folhas cotiledonares.

Aplicando êste método, tentamos inocular 16 plantinhas de *Sida rhombifolia* sadias com o virus da "clorose infecciosa" de *Sida*

rhombifolia e 10 plantas com o virus correspondente de *Sida acuta carpinifolia*. Em cinco plantas destinadas a servir de testemunhas, as picadas foram executadas com agulhas estéreis sem superposição de folhas doentes.

Condensando os resultados de todos êstes ensáios, podemos dizer que em nenhum caso conseguimos a transmissão da doença por suco de pés doentes para plantas sadias. Êste resultado, a-pezar-de inteiramente negativo, é interessante, por concordar plenamente com todas as indicações relativas, da literatura.

1 B) A PASSAGEM DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS POR CONTÁTO E "PSEUDO ENCOSTIA" DAS RAIZES E DO CAULE

Assim como as tentativas de transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por meio de suco, fracassaram também os nossos ensáios que visavam a inoculação de plantas sadias por méro contáto com outras doentes.

Podemos dividir as diversas experiências relativas a êste problema em dois grupos, compreendendo o primeiro as tentativas de transmissão por contáto entre hastes, ao passo que no segundo grupo se reunem alguns ensáios, nos quais o contáto se estabeleceu entre raizes.

a) A eventual transmissão do virus da "clorose infecciosa" por íntimo contáto entre caules.

Já por ocasião dos primeiros ensáios de transmissão da "clorose infecciosa" das malváceas resolvemos verificar se não se conseguiria uma infecção de uma planta sadia, simplesmente amarrando, por meio de ráfia, o seu caule ao de uma planta doente. Chamaremos, a seguir, de "pseudoencostia" a êste tipo de ligações nas quais são amarradas zonas intactas (quer dizer, não lesadas) de hastes. Três pares de tais "pseudoencostias" foram preparados em 20-1-42. Em dois dêles estabeleceu-se um contáto entre um pé sadio e um pé doente da espécie *Sida acuta carpinifolia*, ao passo que no terceiro par só o componente sadio pertencia áquela espécie, enquanto o componente doente era da espécie *Sida rhombifolia*. A-pezar-de termos mantido as plantas em observação durante quasi 11 mêses, as plantas sadias não apresentaram nenhum sinal de doença.

Igualmente negativas foram as nossas tentativas de inocular, por meio de "pseudoencostias" plantas sadias da espécie *Sida rhombifolia*. Com esta espécie realizamos um ensáio em 10-6-43. Dispunhamos, naquela data, de 11 vasos, cada um dos quais continha uma planta sadia (cerca de 10 cms. de altura) de *Sida rhombifolia* à uma pequena distância de uma planta doente da mesma espécie. Em 3

vasos deixamos as plantas desenvolver-se normalmente, sem efetuar uma ligação artificial entre os pares. Em 4 vasos estabelecemos "pseudoencostias" entre a planta sadia e a doente de cada par, e no último grupo de 4 vasos ligamos os pares por enxertia ("encostia").

Neste último grupo observou-se o primeiro caso de transmissão da doença em 23-7-43, isto é, 43 dias após a execução da enxertia. As plantas sadias do primeiro e do segundo grupo, quer dizer, as que cresceram apenas na visinhança das plantas doentes, ou se acharam ligadas a estas na forma de "pseudoencostia", não contrairam a doença, durante os 3 mêses de observação. Deve-se acrescentar ainda, que durante êste ensáio as plantas foram colocadas na estufa e semanalmente fumigadas para excluir a possibilidade da contaminação acidental das plantas sadias por meio de eventuais insetos vetores.

b) A eventual transmissão do virus da "clorose infecciosa" por íntimo contáto entre as raizes.

Maior atenção ainda do que na eventual transmissão da "clorose infecciosa" por meio do contáto entre hastes deve ser dispensada ao estudo da passagem do virus da doença por contáto entre raizes. Isso porque, em condições naturais, as raizes de plantas sadias e doentes, de *Sida*, frequentemente chegam a se emaranhar, estabelecendo, desta maneira, um contáto capaz de facilitar uma possível passagem da doença por seu intermédio. Tentamos reproduzir, no laboratório, da maneira mais perfeita possível, as condições favoráveis à transmissão da doença por contáto das raizes, realizando alguns ensáios preliminares, cuja descrição damos a seguir:

1) Em Janeiro de 1943 tinhamos estimulado em algumas plantas sadias e doentes, de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia*, a formação de raizes aéreas. Eliminamos, para êsse fim, o pequeno cascalho que normalmente, na prática de jardinagem, é usado para impedir a saída das raizes através do furo de drenagem localizado no fundo dos vasos de flores. Deixamos que as pontas de raizes, que então atravessam êsse furo, se desenvolvessem numa atmosfera de elevado gráo de humidade. Para isso colocámos o vaso da planta de *Sida* sôbre outro vaso de barro igual ao primeiro, mas sem terra, contendo apenas uma pequena quantidade de água no fundo, tendo sido para isso o seu orifício préviamente obturado. Nesse ambiente saturado de humidade as raizes alcançaram um comprimento considerável e um diâmetro que permitia a execução de enxertias.

Para efetuar estas enxertias tomamos pares de vasos, cada qual constituido respectivamente de uma planta sadia e de outra doente. Os vasos de cada par encostados um ao outro e fixados nesta posição por meio de uma alça de arame forte, eram mantidos suspensos, por

uma disposição simples, dentro de um vaso de barro de grande diâmetro. Dessa maneira, as raizes das duas plantas podiam mergulhar na água que cobria o fundo do grande vaso. Antes de proceder à enxertia, retiramos do reservatório de água o par de vasos destinados à fornecer o material para a operação e escolhemos, tanto da planta sadia como da doente, uma raiz de comprimento e diâmetro semelhantes e adequados. Na zona da raiz, reservada para a encostia, cortamos, com uma tesoura esterilisada, as raizes laterais. Lesamos, depois, as superfícies de contáto, quer por meio de uma navalha, ou — o que deu resultados mais satisfatórios — por friccionamento com uma espátula de vidro coberta com carborundum. Depois de encostarmos as superfícies lesadas das raizes, fixamos a ligação com algumas voltas de tiras finas de celulóide gomado ou de ráfia (Estampa 11, fig. *A*). Depois, o par gêmeo de vasos voltou para o receptáculo, onde as raizes podiam outra vez mergulhar no líquido. Pouco a pouco conseguimos, em alguns detalhes, uma melhora da técnica. Nos ensáios ulteriores, por exemplo, cultivamos as plantas de *Sida* em vasos que tinham, em lugar de furos centrais de irrigação, furos laterais. Com a mencionada alça de arame podia-se prender um par de vasos preparados com êsse dispositivo, de maneira que justamente as duas aberturas se tocassem. Êsse dispositivo, do qual vemos um exemplo na figura B, permite o aproveitamento, mesmo de raizes curtas, que normalmente não podem servir, para enxertias.

Passando agora à relatar os resultados destes ensáios, deve-se mencionar, em primeiro lugar, que na maioria dos casos o crescimento das raizes não ficou prejudicado em consequência da operação executada. As pontas das raizes continuaram crescendo e mesmo emitindo raizes laterais abaixo da zona da enxertia.

O primeiro ensáio desse tipo foi executado em 3-3-43 com tres pares de plantas. Os componentes sadios dessas enxertias pertenciam todos à espécie *Sida rhombifolia*, os componentes doentes, em um caso à mesma espécie e nos dois restantes à espécie *Sida acuta carpinifolia*. Uma nova série, desta vez composta de dois pares de enxertias homoplásticas da espécie *Sida rhombifolia*, efetuou-se em 24-3-43. Na penúltima e última série, que foram executadas respectivamente em 20-5 e em 12-6, renovamos algumas ligações já desfeitas, dos ensáios anteriores, e efetuamos mais 2 pares de enxertias homoplásticas de cada uma das espécies *Sida rhombifolia* e *Sida acuta carpinifolia*. Só em um caso dentre esses 9 pares de enxertias de raizes, observamos, no componente sadio, o aparecimento de algumas folhas cloróticas. Diante do fato, porem, de termos feito essa verificação já dois dias após a execução da enxertia, achamos muito provavel que neste caso a planta considerada

por nós como sadia já tinha sido infeccionada antes da operação. Em nenhum outro caso — e isso durante um período de observação de mais de seis mêses — pudemos constatar nos componentes sadios quaisquer sintomas que tivessem indicado uma passagem do virus da "clorose infecciosa" da planta doente para o pé sadio, mediante enxertia de raizes. Embora ainda precisem estes ensáios de uma confirmação por pesquisas organizadas com séries de plantas mais numerosas, não acreditamos que a enxertia de raizes constitúa um meio facil da transmissão e disseminação do virus da "clorose infecciosa".

2) A PASSAGEM DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS POR MEIO DAS SEMENTES

A) Ensáios de germinação com sementes de diversas espécies do gênero Sida.

No decorrer dos nossos trabalhos tivemos ocasião de executar dezenas de ensáios de germinação que compreenderam milhares de sementes de *Sida*. Podemos resumir as observações feitas nas plantinhas que nasceram dessas sementes afirmando que nunca verificamos entre as nossas sementeiras um único caso nítido de "clorose infecciosa". E' verdade que observamos frequentemente que as plantinhas saiam da terra com folhas cotiledonares tortas ou cloróticas. Entretanto já a primeira folha definitiva não mais exibiu o menor sinal de clorose. Não conseguimos tambem estabelecer a existência de uma correlação entre as mencionadas anomalias das folhas cotiledonares e a origem das sementes; averiguamos a ocorrência dessas anomalias aproximadamente com a mesma frequência tanto em plantas nascidas de sementes de plantas sadias como nas desenvolvidas de sementes de plantas doentes. Achamos porem possivel, que o virus da "clorose infecciosa", infiltrando-se no embrião das sementes em formação, não produziria uma clorose das plantas da proxima geração, mas sim evitaria completamente o desenvolvimento das sementes infeccionadas. Um tal efeito inibidor do virus sôbre a germinação das sementes devia evidenciar-se pela comparação da porcentagem de germinação de sementes provenientes de plantas sadias e de doentes. Vários ensáios desta natureza foram realizados, obedecendo sempre ao seguinte método:

Uma caixa de semeadura, cheia de uma mistúra homogênea de terra e areia, foi subdividida, por meio de um sarrafo, em duas metades. Numa das metades da caixa semearam-se 100 sementes obtidas de plantas sadias, na outra metade, numero igual de sementes colhidas de plantas doentes. Semanalmente efetuamos contagens das sementes germinadas, continuando essas observações durante alguns mêses.

Reunimos os resultados desses ensáios na tabela seguinte:

TABELA 2

Porcentagem de germinação de sementes de *Sida*, colhidas respectivamente de plantas sadias e doentes

Sementes de plantas sadias				Sementes de plantas doentes				
Espécie	Marcação da amostra	N.º de sem. germinadas	Média	Espécie	Marcação da amostra	N.º de sem. germinadas	Média	Período de observ.
				A) Ensáio de 24-3-1942				4 mêses
S. rhombifolia	N.º 333	68	66,5	*S. rhombifolia*	N.º 131	12		
» »	N.º 336	65		» »	N.º 135	9	27	
				» »	N.º 74	60		
S. acuta carp.	N.º 112	43	43	*S. acuta carp.*	N.º 190 a	0		
» » »	N.º 117	43		» » »	N.º 194 a	45	19,5	
					N.º 27 b	31		
					N.º 190 b	2		
				B) Ensáio de 28-7-1942				4 mêses
S. acuta carp.	N.º 112	74	63	*S. acuta carp.*	N.º 27	22		
» » »	N.º 112	46		» » »	N.º 27 a	40		
» » »	N.º 117	69		» » »	N.º 190	78	50,6	
				» » »	N.º 27 b	54		
				» » »	N.º 194	59		
				C) Ensáio de 26-5-1943				3 mêses
S. rhombifolia	N.º I. B.	63	63	*S. rhombifolia*	N.º I. B.	56	56	

Pode-se inferir dos dados desta tabela, que em geral a porcentagem de germinação das sementes colhidas de plantas doentes é ligeiramente inferior à das sementes obtidas de plantas sadias. Deve-se levar, porem, em contá, que muitos fatores exercem influência no processo de germinação. Lembramos aqui, por exemplo, que o resultado da germinação depende do lapso de tempo transcorrido a partir da colheita, isto é, da duração do período de repouso das sementes. Assim se explica que sementes de uma origem, que num ensáio anterior não chegaram absolutamente a germinar, podem mostrar, 4 mêses mais tarde, uma porcentagem de germinação bastante satisfatória. Isso se deu nas nossas experiências, com a origem N.º 190, que em Março demonstrou um poder germinativo muito baixo, e se distinguiu em Julho por índices de germinação bastante elevados. Diante dessa grande variação do poder germinativo, mesmo de uma única amostra de sementes, achamos prematuro atribuir demasiada importância às diferenças de porcentagem de germinação entre as sementes de plantas sadias e doentes. Mesmo com esta restrição, não podemos fugir à impressão de que as sementes colhidas de plantas sadias germinam com maior facilidade do que as de pés doentes. E' possivel que — conforme a nossa suposição anterior — o próprio virus, penetrando no embrião, constitúa um obstáculo ao prosseguimento da germinação.

Poder-se-ia porem admitir tambem que geralmente as plantas doentes formam menor quantidade de assimilados que as sadias, e que por isso tambem as sementes das plantas doentes são providas de um estoque mais reduzido de substâncias de reserva. Tal escassez relativa de substâncias de reserva, poderia tambem resultar em um fraco poder germinativo delas. E' dificil decidir qual dessas hipóteses corresponde, com efeito, à realidade.

Tentamos forçar a germinação das sementes, tratando-as antes de iniciar a prova de germinação, durante meia hora, com ácido sulfúrico concentrado. Quizemos por esse processo estimular o desenvolvimento justamente das sementes que sem tratamento não chegaram a germinar, pensando que talvez as plantinhas saídas dessas sementes refratárias poderiam manifestar sintomas da "clorose infecciosa" e confirmar, assim, a veracidade da primeira hipótese.

Ensáios preliminares sobre o efeito de um tratamento prévio das semente de *Sida* com ácido sulfúrico foram executados em 5-5 e 7-5-42. Esses ensáios mostraram que, de fato, esse tratamento estimula a germinação das sementes de *Sida*. Em seguida, fizemos frequentemente uso desse método para obter, nos nossos ensáios de germinação, a porcentagem máxima de sementes germinadas. Esse processo foi tambem

aplicado no ensáio de 26-5-43, indicado no item C) na nossa tabela. Não pudemos verificar, porem, nem nesta nem em outras experiências, o aparecimento de plantinhas atacadas pela "clorose infecciosa" entre as culturas obtidas com sementes de plantas doentes. Estamos, por isso, inclinados a acreditar que, pelo menos no gênero *Sida*, a "clorose infecciosa" não é transmitida pelas sementes e que uma eventual inferioridade das sementes provenientes de plantas doentes no tocante ao seu poder germinativo se explica pela sua relativa escassez em substâncias de reserva.

B) Ensáios de germinação com sementes de *Abutilon striatum* Dicks var. *spurium*.

As plantas cloróticas de *Abutilon spurium* que obtivemos nos viveiros da Prefeitura da Capital, floresceram abundantemente e produziram também uma quantidade razoavel de sementes. A-fim-de evitar a perda dessas sementes, protegemos algumas flores no estado postfloral, com sacos de celofane, colhendo depois individualmente as sementes de cada planta.

Com essas sementes executamos 3 ensáios de germinação, respectivamente em 19-3, 9-4 e 20-5-43.

No primeiro destes ensáios 10 sementes de cada vez, de 11 plantas de *Abutilon spurium*, foram deixadas germinar em uma mistura de terra e areia. As sementes de 8 diversas origens em um total de 80 não chegaram a germinar. Das amostras restantes, duas produziram 2 plantinhas e a última 1 plantinha.

O segundo ensáio foi efetuado com sementes de uma só origem, subdivididas em 5 lotes de 10 sementes para cada vez. Em 4 destes lotes aplicaram-se diversos processos para estimular a germinação (lesão mecânica da membrana, permanência na geladeira e tratamento com agua quente e ácido sulfúrico) ao passo que o último lote serviu de testemunha. Das 50 sementes plantadas germinaram apenas 3, pertencentes respectivamente aos lotes guardados na geladeira, tratados com agua quente, e às testemunhas.

O último ensáio constitue, em grandes linhas, uma repetição da primeira experiência: 10 sementes, de cada uma de 9 diversas origens de *Abutilon spurium*, foram plantadas após terem sido submetidas, durante meia hora a um tratamento com ácido sulfúrico. As sementes de 5 origens ficaram sem germinar e em cada uma das amostras restantes desenvolveu-se uma planta. Do total de 90 sementes estudadas apenas 4 chegaram à produzir plantinhas.

Resumindo os resultados destes 3 ensáios devemos frizar que nesta espécie as sementes apresentam uma porcentagem muito baixa

de germinação. Este resultado está de acordo com as observações de J. Y. KEUR (9-1934), que confirmam as indicações de trabalhos mais antigos provando que no gênero *Abutilon* só as sementes que resultam de cruzamentos interclonais e até interespecificos têm bôa capacidade de germinar. No nosso caso é bem possivel que as plantas pertencessem ao mesmo clone e que, alem disso, em algumas flores se tivesse realizado uma autofecundação. Assim, não podemos extranhar o báixo poder germinativo das nossas sementes.

Merece ainda ser destacado um outro resultado destes ensáios. Queremos nos referir ao fato de que, entre as plantas desenvolvidas na primeira e na terceira série de ensáios, apareceram algumas com aspéto bem anormal. Das 5 plantinhas do primeiro ensáio uma apresenta-se com as folhas um pouco encrespadas, ao passo que uma segunda tem folhas nitidamente cloróticas. Desta última planta queremos dar uma descrição um pouco mais detalhada: atualmente, isto é, 5 mêses depois da prova da germinação, a planta já está com 11 folhas; as 6 folhas basais são bem expandidas e de um verde uniforme; as 3 folhas médias têm as margens viradas para baixo e uma superfície ligeiramente crespa; nas duas folhas superiores, finalmente, distinguem-se manchas angulares cloróticas, de área irregular, do tipo das manchas causadas pela "clorose infecciosa".

Só futuras experiências poderão mostrar se esta planta e os outros pés de folhas enrugadas contêm, de fato, o virus da "clorose infecciosa".

3) A TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS POR ENXERTIA

Depois dos insucessos das tentativas de transmissão da "clorose infecciosa" por meio de suco, dirigimos nossa atenção ao estudo da transmissão da doença por enxertia. O objeto destes estudos consistiu em verificar se é de fato de natureza infecciosa a doença disseminada entre as plantas dos nossos campos. Dada a grande semelhança dos sintomas de clorose, causados por fatores genéticos, por deficiência de alimentação, ou por doenças de virus, só os resultados de experiências de transmissão por enxertia permitem uma clara distinção desses diversos tipos de clorose.

Apezar de havermos extendido estes estudos, mais tarde, a diversas espécies de *Sida*, vamos relatar primeiro os resultados de ensáios de transmissão efetuados numa só especie, isto é, na vassourinha (*Sida acuta* BURM. var. *carpinifolia* (L.) K. SCHUM).

I) Resultados de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio

de enxertias realizadas com plantas de *Sida acuta* var. *carpinifolia*.

A) Exemplo do protocolo de uma experiência.

Daremos a seguir a descrição de uma experiência típica, realizada em 14-3-42 e consistindo na execução de enxertia de um garfo doente de planta M-205 em um cavalo sadio de planta M-83, ambas da espécie *Sida acuta* var. *carpinifolia*.

O garfo era provido de duas folhas, ambas apresentando algumas manchas cloróticas e nítido esclarecimento das nervuras; êste garfo foi inserido a 2,5 cm. abaixo do ápice e a 53 cm. acima da base da planta.

O cavalo, em 6-4, 23 dias após a enxertia, não apresentou sintomas da doença a-pesar-do bom pegamento do enxerto.

Em 18-4, 35 dias após a enxertia, notamos placas cloróticas difusas em folhas novas de ramos inseridos a 29 e 31 cm. abaixo da zona de enxertia. Também em folhas novas inseridas diretamente ao longo da haste enxertada do cavalo, observam-se sintomas de clorose difusa e esclarecimento das nervuras.

Em 22-4, 39 dias após a enxertia, notaram-se sintomas típicos de clorose nas folhas novas de todos os ramos que estavam inseridos na haste enxertada no mesmo lado do enxerto. As folhas dos ramos inseridos no lado oposto ao da haste enxertada, e de outras hastes não apresentavam sintomas.

Em 11-5, 58 dias após a enxertia, as folhas de todos os ramos da haste enxertada, tanto em cima como abaixo da zona de enxertia, exibem sintomas da doença; a haste não enxertada está sem sintomas.

Em 9-7, 147 dias após a enxertia, a doença não passou para a haste não enxertada, no sentido acropetal.

Em 31-7, 139 dias após a enxertia, as folhas de todos os ramos apresentavam manchas da "clorose infecciosa", com exceção de um único ramo lateral, inserido perto da base da haste não enxertada.

Deste exemplo já podemos tirar algumas conclusões interessantes:

1) A doença passou do enxerto doente para o cavalo sadio, após um bom pegamento dos dois componentes.

2) Da data da realisação da enxertia até o momento do aparecimento dos primeiros sintomas passaram-se 35 dias. Este período de tempo, compreendendo o intervalo entre a execução da enxertia e o aparecimento dos primeiros sintomas no componente antes sadio, será chamado daqui em diante "período de incubação".

A duração deste período constitue, dentro de certos limites, uma medida para o maior ou menor êxito de uma experiência de transmissão.

3) O aparecimento de sintomas nas diversas partes do componente da enxertia, antes sadio, obedece à uma certa sequência, que provavelmente indica o caminho do agente causador, dentro da planta. No nosso caso, o agente causador desceu, primeiro, na haste enxertada, ao

TABELA 3

Resultados de transmissão do virus da "clorose infecciosa" em enxertias de *Sida acuta carpinifolia*.

N.º da experiência	Data da experiência	Combinação da enxertia	Método de enxertia	N.º de enxertos pegados com transmissão da doença	N.º de enxertos pegados sem doença	N.º de enxertos não pegados	Período de incubação em dias	Período médio de incubação em dias
1 a	19 - 1 - 942	*Sida acuta* doente lig. com *Sida acuta* sadia	contáto	—	2	—	—	—
1 b	19 - 1 - 942	*Sida acuta* doente lig. com *Sida acuta* sadia	encostia	2	2	—	32, 113	72,5
1 c	19 - 1 - 942	*Sida acuta* sadia sôbre *Sida acuta* doente	garfagem	2	—	—	48, 60	54
1 d	19 - 1 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	4	1	—	50, 50, 50, 50	50
2 a	14 - 3 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	2	—	—	26, 35	30,5
2 b	14 - 3 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo removido depois de 6 dias de contáto)	garfagem	2	2	—	23, 23	23
2 c	14 - 3 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo removido depois de 11 dias de contáto)	garfagem	4	—	—	23, 26, 34, 58	35,2
3	16 - 3 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	5	—	1	21, 24, 33, 33, 37	29,6
5 a	10 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	10	1	—	22, 22, 29, 31, 31,	
5 b	10 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo removido depois de 2 dias de contáto)	garfagem	1	3	—	31, 60, 60, 60, 60 29	40,6 —
5 c	10 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo removido depois de 4 dias de contáto)	garfagem	1	3	—	31	—
6 a	23 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo exposto à 30°C.)	garfagem	4	—	1	20, 46, 46, 102	53,5
6 b	23 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo exposto à 40°C.)	garfagem	3	1	1	44, 102, 158	101,3
6 c	23 - 4 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo exposto à 50°C.)	garfagem	—	—	5	—	—
6 d	12 - 5 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia (garfo exposto à 45°C.)	garfagem	—	—	5	—	—
7	29 - 7 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	1	—	5	47	—
14 a	21 - 12 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	6	—	2	19, 19, 19, 19, 19, 98	32,1 (5x19)
23 c	17 - 6 - 942	*Sida acuta* doente sôbre *Sida acuta* sadia	garfagem	3	1	—	14, 37, 84	45

longo de uma ortóstica, passou depois para o outro lado da mesma haste e para o ápice, para entrar finalmente, em direção acropetal, numa segunda haste da planta profundamente bifurcada.

Estas observações sugerem um transporte relativamente lento do virus dentro da planta infeccionada.

B) Resultados dos outros ensáios referentes à transmissão da "clorose infecciosa" por enxertia entre plantas da espécie *Sida acuta* var. *carpinifolia*.

É claro que existem, em torno do problema da transmissão da doença "clorose infecciosa" por enxertia numerosas outras questões que não podem ser resolvidas com uma única experiência. Seria de interesse, por exemplo, averiguar até que ponto o éxito de transmissão da doença depende do método de enxertia, da localização do componente doente em relação ao sadio, do tempo do contáto entre os dois componentes da enxertia, ou da severidade dos sintomas que exibe o componente doente. A-fim-de podermos avaliar melhor a influência de alguns desses fatores, reunimos, na tabela 3, os resultados de todos os nossos ensáios de transmissão, por enxertia, da doença "clorose infecciosa" entre plantas pertencentes à espécie de *Sida acuta* var. *carpinifolia*.

Resumindo os resultados desta tabela, podemos dizer que entre os 86 casos de tentativa de transmissão aí reunidos, em 50 casos se efetuou uma nítida passagem da doença do componente antes doente, para o componente antes sadio. Não se pode duvidar portanto de que o método de enxertia constitua um meio eficiente de transmissão experimental da doença.

Precisamos agora completar esse resultado pela exposição dos diversos fatores que contribuiram para o êxito e a velocidade da transmissão, e por observações relativas à natureza da doença.

C) A influência de diversos fatores no éxito da transmissão da "clorose infecciosa" por enxertia.

1) A influência do método de enxertia.

Na maioria dos ensáios de transmissão da "clorose infecciosa", fizemos uso do método de garfagem simples axilar (Est. 14, fig. *H* e est. 15, fig. *I*). Só o ensáio N.º 1b se refere à alguns casos em que se empregou o método de encostia. Embora este ensáio compreenda um número assás reduzido de exemplares para fornecer uma base de comparação exata da eficiência relativa dos métodos de garfagem e de encostia, quer-nos parecer que a transmissão da "clorose infecciosa" se efetua com maior rapidez e segurança pelo método de garfagem do que pelo processo de encosto. Por outro lado, já vimos no capítulo

1B que pelo puro contáto de plantas sadias e doentes, obtido amarrando, com ráfia, ramos não lesados de um componente doente e um sadio, não se consegue (veja ensáio 1a) a transmissão da doença. Esta transmissão só se verifica em casos de efetiva enxertia entre os 2 componentes. Aliás em nenhum dos casos enumerados na tabela 3, nos quais o enxerto secou sem entrar em contáto orgânico com o cavalo (por exemplo, nos casos anotados na coluna 7 dos ensáios ns. 3, 6a, 6b, 6c, 6d, 7 e 14a) observamos uma transmissão da doença.

2) A influência da natureza do componente doente ("enxerto" ou "cavalo"). Na quasi totalidade dos casos considerados na tabela 3 tratava-se da passagem da doença, do enxerto doente para o cavalo sadio. O ensáio n.º 1c porem, evidencia que a doença também é transmissivel do cavalo doente para o enxerto sadio.

Se o período de incubação neste último caso parece talvez um pouco mais dilatado do que na maioria dos outros exemplos, a causa dessa diferença deve ser procurada no maior abalo que o enxerto sofre em consequência do processo de enxertia, em relação ao cavalo. Sabendo que os sintomas da "clorose infecciosa" se evidenciam primeiro nas folhas novas, e considerando que o enxerto leva mais tempo que o cavalo após o processo de enxertia, para emitir novas folhas, é natural que os sintomas da doença se manifestem com maior rapidez num "cavalo" do que num "enxerto".

3) A influência da duração de contáto entre os dois componentes da enxertia.

Os ensáios de 14-3-42 (N.º 2a, 2b e 2c) e de 10-4-42 (N.º 5a, 5b e 5c) foram efetuados com o fim especial de verificar qual a influência de uma remoção prematura do enxerto doente, na passagem da doença para o cavalo antes sadio. No primeiro destes ensáios foram removidos 4 enxertos, respectivamente 6 e 11 dias depois da enxertia. O resultado desta experiência mostra que um contáto entre os componentes da enxertia durante 11 dias era suficiente, em 100 % dos casos, para permitir a passagem do virus para o cavalo sadio. No ensáio em que havia contáto apenas durante 6 dias, só na metade dos casos o agente causador da doença passou para o componente sadio. Menor ainda foi a porcentagem dos casos positivos de transmissão nos ensáios de 10-4-42, nos quais a separação entre enxerto e cavalo foi efetuada respectivamente 2 e 4 dias após a enxertia. Mesmo assim, merece ser destacado o fato de que, em um caso, o contáto de 2 dias apenas entre enxerto e cavalo foi suficiente para permitir a passagem do agente causador da doença. Este caso é interessante porque mostra que a diferença entre a "clorose infecciosa", e o grupo de doenças de

virus transmissiveis por suco, talvez não seja tão grande como sempre se admitiu.

Alem desse resultado geral, queremos destacar ainda aqui uma observação mais detalhada, que tem relação com esses dois ensáios. Em todas as enxertias, nas quais se efetuou uma passagem da doença para o cavalo, apesar da remoção prematura do enxerto, pudemos observar um período de incubação notavelmente curto. Poderia parecer, para um experimentador menos avisado, que a interrupção prematura do contáto entre cavalo e enxerto favoreceria a passagem da doença, em vez de dificulta-la. Na verdade, porem, a relação entre causa e efeito, neste caso, é inversa.

Nas experiências de remoção prematura do garfo, a passagem da doença para o cavalo só se realiza quando o virus é veículado com grande velocidade. Nos outros casos, retirado o garfo, não se verifica uma transmissão da doença. Se, porem, os dois componentes ficam ligados, pode-se dar ainda uma passagem da doença depois de um prazo relativamente longo. Isso quer dizer que os casos em que, nos ensáios de ligação contínua, a transmissão se désse depois de um longo período de incubação, figurariam, nos ensáios de remoção prematura do garfo, entre os exemplos negativos de transmissão. A interrupção prematura do contáto entre dois componentes da enxertia não facilita, portanto, a passagem da doença do enxerto para o cavalo; antes a restringe aos casos em que já em si a difusão do virus na planta é favorecida (por exemplo pelo bom pegamento dos componentes, pela iluminação, abundância de brotos novos, etc.).

Desta maneira se explica a aparente discordância entre os resultados das experiências executadas com e sem interrupção prematura do contáto entre os componentes da enxertia.

4) Influência de outros fatores.

Do estudo cuidadoso dos nossos protocolos deduz-se que ha ainda uma série de outros fatores que têm importância para o éxito da transmissão da doença. Entre esses, mencionamos em primeiro lugar a severidade dos sintomas exibidos pelo componente doente. Em vários ensáios de enxertia verificamos que a transmissão da doença se realiza com especial éxito se o enxerto doente apresenta um número relativamente grande de folhas com sintomas nítidos. Por outro lado, a transmissão se torna duvidosa se o enxerto perde completamente as folhas, ou se estas apresentam apenas sintomas difusos ou apagados.

Outros fatores importantes para o resultado dos ensáios de transmissão por enxertia são a luz e a temperatura. Iluminação forte e temperatura alta favorecem o aparecimento dos sintomas. Entende-

mos, assim, facilmente, a diferença existente entre os resultados dos nossos ensáios 7 e 14a. No primeiro destes, que foi realizado em pleno inverno, apenas em uma única de 6 enxertias a doença passou para o componente antes sadio, e isso num período de incubação de 47 dias. No segundo ensáio, executado em Dezembro e compreendendo 8 enxertias, a doença passou num total de 6 casos. Este resultado torna-se ainda mais interessante se acrescentarmos que em 5 dos 6 casos positivos a doença passou do componente doente para o sadio no praso mínimo de 19 dias e que só num caso o período de incubação foi mais longo (98 dias).

Depois de ter focalisado, nos itens anteriores, alguns fatores que exercem influência na transmissão da "clorose infecciosa", vamos relatar ainda algumas observações que se referem à natureza desta doença.

D) Observações a respeito da maneira da transmissão e da natureza da doença "clorose infecciosa".

1) O modo de manifestação dos primeiros sintomas.

Assim como em muitas outras doenças de virus, tambem no caso da "clorose infecciosa" os sintomas se manifestam primeiro em folhas que se acham ainda no estado de diferenciação. Desta maneira, o observador que quer verificar se a doença passou ou não para uma planta antes sadia, deve examinar de preferência as pequenas folhas inseridas na ponta da haste principal e de todos os ramos laterais. No gênero *Sida*, porem, as folhas novas tambem se desenvolvem, frequentemente, longe das pontas, em qualquer zona da haste, tendo a sua origem nas gêmas dormentes.

Em geral, folhas muito novas, recentemente infeccionadas, são bastante distintas das sadias, devido à sua coloração pronunciadamente amarela, que pode extender-se à totalidade ou só a uma parte da folha. Em folhas novas, porém já um pouco mais desenvolvidas, nota-se frequentemente, como primeiro sintoma, um esclarecimento amarelo das nervuras. (Estampa 14, fig. *H*). Em outros casos observa-se, ao longo de uma nervura secundária, apenas um ligeiro esclarecimento, que evolue, depois do desenvolvimento da folha, em uma mancha elítica atravessada pela nervura. Finalmente deve ser mencionado o caso frequente, em que se manifestam inicialmente, nas folhas novas, apenas manchas difusas, pouco perceptiveis, que se distinguem do resto do limbo unicamente por uma tonalidade de verde ligeiramente mais claro. Essas áreas um pouco mais claras podem transformar-se mais tarde nas manchas angulares amarelas, típicas da "clorose infecciosa".

Em casos de uma infecção já mais adiantada, o sintoma de "esclarecimento das nervuras" acha-se sempre restrito às folhas bem no-

vas, ao passo que as folhas basais dos ramos, isto é, as que já alcançaram o tamanho definitivo, apresentam manchas angulares. Nestas últimas folhas nota-se tambem, às vezes, um ligeiro encrespamento e ondulamento do limbo e uma leve deformação, que entretanto nunca é ligada à uma forte redução do limbo.

2) Localisação, ordem e sequência das folhas que apresentam sintomas da "clorose infecciosa".

Já do exemplo do nosso protocolo, descrito no item I-*A* pudemos inferir que em geral, depois da infecção da planta por meio de enxertia, a doença não se manifesta simultaneamente em todas as folhas novas do componente da enxertia, antes sadio. É verdade que, muitas vezes, nas nossas experiências, a primeira folha nova apareceu na visinhança do garfo enxertado. Frequentemente verificamos, por exemplo, o aparecimento de sintomas em folhas novas do ramo em cuja axila o garfo estava inserido. Este desenvolvimento das primeiras folhas doentes do cavalo, na imediata visinhança da zona de inserção do enxerto, não pode ser considerado, porem, como regra. Observamos, em outros casos, que os primeiros sintomas da doença se manifestam em folhas, inseridas 30 cm e mais distantes da zona de enxertia.

Se bem que o lugar do aparecimento da primeira folha doente não possa ser previsto com grande segurança, indicações um pouco mais exátas podem ser feitas a respeito da direção que o agente causador da doença toma no componente da enxertia recentemente infeccionado, e do limite da sua disseminação.

Queremos evidenciar estas observações no exemplo dos nossos ensáios 2-a, 2-b, 2-c e 3 de 14 e 16-3-942 (veja tabela 3).

Somando os casos positivos de todos estes ensáios, obteremos um total de 13 casos de passagem do virus da "clorose infecciosa" por enxertia. Verificamos, dos nossos protocolos, que em 10 destas 13 enxertias os primeiros sintomas apareceram numa situação basal em relação à zona da enxertia. Nos 3 casos restantes apareceram, simultaneamente, folhas com sintomas da doença acima e abaixo da zona da enxertia.

Não podemos dizer com certeza se nos 10 casos em que os primeiros sintomas da doença se tornaram patentes em folhas inseridas em direção basipetal com relação ao lugar do enxerto, o virus de fato somente mais tarde atingiu o ápice, ou se apenas nesta zona apical não se tinham formado novas folhas na referida época.

A-pezar desta dúvida, os resultados corroboram a idéia de um transporte preferivelmente basipetal, do virus da "clorose infecciosa", pelo menos nas condições da nossa experiência.

Esta conclusão é ainda apoiada por uma outra série de observações. Queremos nos referir mais uma vez aos 13 casos de transmissão positiva da doença, obtidos nos mesmos ensáios citados na tabela 3. Em 6 destes casos os cavalos apresentavam uma bifurcação perto do colo da planta. Assim, cada uma dessas plantas era constituida de 2 hastes, aproximadamente equilaterais, das quais apenas uma era enxertada. Pois bem, em 4 desses 6 casos o virus levava mais de 4 mêses para alcançar a haste não enxertada. Em um dos dois casos restantes só depois de 4 mêses apareceram, na haste não enxertada, algumas folhas com sintomas da doença, mas apenas na zona basal situada perto da bifurcação. Finalmente, no último caso, na haste não enxertada, 3 mêses após a enxertia observamos sintomas da doença, mas sob a forma de manchas muito difusas e apagadas, que nunca alcançaram a nitidez da clorose apresentada pelas folhas da haste enxertada.

Observações semelhantes foram feitas por ocasião de outros ensáios. Podemos resumir os resultados de todas estas observações relativas à disseminação do virus da "clorose infecciosa" na planta recentemente infeccionada, nos seguintes termos:

1) — O transporte do virus pode-se realizar no sentido acro — e basipetal; parece, porem, que o transporte no sentido basipetal é mais frequente e rápido;

2) — Nota-se tambem às vezes uma disseminação preferencial do virus numa planta ao longo de uma ortóstica;

3) — A passagem do virus de uma a outra haste de uma planta bifurcada realiza-se com grande dificuldade e demora. (Tambem na natureza encontramos frequentemente plantas doentes nas quais uma haste ou tambem um ramo lateral estão isentos de folhas com sintomas da doença).

4) — Ha casos de infecções em que a severidade dos sintomas apresentados pelas folhas do componente recem-infeccionado diminue com a distância delas do fóco de infecção, (i. e. do componente doente da enxertia).

Volveremos a considerar alguns destes resultados na parte deste trabalho consagrada à discussão.

II) Resultados de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio de enxertias realizadas com diversas espécies do gênero *Sida*.

Reunimos, no capítulo anterior, todas as observações relativas à passagem da "clorose infecciosa" entre componentes de enxertias apenas da espécie *Sida acuta* var. *carpinifolia*. Agora devemos completar

esses resultados referindo as experiências de transmissão executadas com outras espécies de malváceas. Dispensamos grande atenção, justamente a esta parte dos nossos estudos, por considerarmos a comparação da "clorose infecciosa" manifestada em diversas espécies de malváceas, um dos fins precípuos deste trabalho.

Enquanto as plantas doentes usadas principalmente nos primeiros ensáios, eram da espécie *Sida acuta* var. *carpinifolia*, facilmente encontrada nas imediações do nosso laboratório, situado então no Parque Modelo (Tremembé), as áreas desocupadas dentro do próprio terreno do Instituto Biológico em Vila Mariana forneceram copioso material de pés doentes de duas outras espécies de *Sida*, a saber: *Sida rhombifolia* L. e *Sida cordifolia* L.. Foi aumentado o número das fontes de material doente pela remessa de mudas de *Abutilon spurium*, gentilmente cedidas pelo Snr. Diretor da Divisão de Matas, Parques e Jardins da Prefeitura da Capital. Material sadio das mesmas e de outras espécies de malváceas foi obtido, geralmente, com grande facilidade, a partir de sementes. Só no gênero *Abutilon* a porcentagem de sementes que chegou a germinar, foi pouco satisfatória. Para remediar esse mal, fizemos então uso de estacas de *Abutilon* das seguintes procedências:

a — de *Abutilon striatum* DICKS (de exemplares adquiridos da Casa Flora, Germano Zimber), e

b — de *Abutilon striatum* DICKS var. *spurium* "sem sintomas" (de exemplares encontrados entre as mudas provenientes da Prefeitura).

Usamos estas mudas "sem sintomas" em comparação com as mudas doentes da mesma origem e com as sadias de *Abutilon striatum* DICKS da Casa Flora.

Devemos a classificação de todas estas espécies à grande gentileza do Diretor do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, Dr. F. C. HOEHNE.

Para melhor facilitar a compreensão dos nossos resultados, não mais os apresentaremos em ordem cronológica, na tabela seguinte. Achamos, pois, mais conveniente reunir em grupos todas as experiências realizadas respetivamente com as espécies *Sida rhombifolia* L. e *Sida cordifolia* L..

Dentro de cada grupo anotamos primeiro os ensáios relativos à transmissão da doença por meio de enxertias homoplásticas, referindo-nos depois às enxertias compostas de duas diferentes espécies.

Desta tabela pode-se inferir, como resultado geral, o fato de que o virus causador da "clorose infecciosa" de *Sida rhombifolia* é transmissivel, por meio de enxertia, não só para plantas da mesma espécie,

TABELA 4

Ensáios de transmissão da "clorose infecciosa" entre diversas espécies do gênero Sida

N.º da experiência	Data da experiência	Combinação de enxertia	Método de enxertia	N.º de enxertos pegados com transmissão da doença	N.º de enxertos pegados sem transmissão da doença	N.º de enxertos não pegados	Período de incubação em dias	Período médio de incubação	Comparação com os ensáios da Tab. 3, números
8 a	19 - 10 - 42	*Sida rh.* d o e n t e sôbre *S. rh.* sadia	garfagem	3		7	17, 21, 30	22,7	1d, 2a, 3, 5a, 14a
15 a	29 - 12 - 42	*Sida rh.* d. sôbre *S. rh.* s.	garfagem	1		3	14		2a
17 a	9 - 2 - 43	*Sida rh.* d. sôbre *S. rh.* s.	garfagem	7	1	2	13, 14, 20, 22 } 25, 33, 33 }	37,14	2a
21 a	10 - 6 - 43	*Sida rh.* s. sôbre *S. rh.* d.	encostia	2	2		43, 62	52,5	1b
21 b	10 - 6 - 43	*Sida rh.* s. sôbre *S. rh.* d.	Pseudo-encostia		4				1a
21 c	10 - 6 - 43	*Sida rh.* s. ao lado de *S. rh.* d. . .	testemunha		3				1a
9	29 - 10 - 42	*Sida ac.* d. sôbre *S. rh.* s.	garfagem	1		5	43		
10	11 - 11 - 42	*Sida ac.* d. sôbre *S. rh.* s.	garfagem	4	3	3	34, 50, 108, 110	75,5	5a, 14a
11 a	12 - 11 - 42	*Sida ac.* d. sôbre *S. rh.* s.	garfagem	4			27, 33, 36, 36	33	5a, 14a
11 b	12 - 11 - 42	*Sida ac.* sem sint. sôbre *S. rh.* s. . .	garfagem		4	1			
19 b	15 - 3 - 42	*Sida ac.* d. sôbre *S. rh.* s. (a partir de *Abutilon spurium*)	garfagem	7	6		10, 32, 41, 44, } 45, 66, 67 }	43,57	
1 e	19 - 1 - 42	*Sida rh.* d. sôbre *S. acut.* s.	garfagem	1	3		112		5a, 14a
4	20 - 3 - 42	*Sida rh.* d. sôbre *S. acut.* s.	garfagem	1		6	42		
14 b	21 - 12 - 42	*Sida rh.* d. sôbre *S. acut.* s.	garfagem	1		8	41		
17 b	9 - 2 - 43	*Sida rh.* d. sôbre *S. acut.* s.	garfagem	2		6	14, 20	17	14a
1 f	19 - 1 - 42	*Sida ac.* s. sôbre *S. rh.* d.	contáto		2				
1 g	19 - 1 - 42	*Sida ac.* s. sôbre *S. rh.* d.	garfagem	3			60, 60, 61	60	1c
20 a	1 - 4 - 43	*Sida ac.* s. sôbre *S. rh.* d.	garfagem	2			29, 50	39,5	1c
15 b	29 - 12 - 42	*Sida cordif.* d. sôbre *S. rh.* s. . . .	garfagem	5		1	14, 14, 14, 17, 56	23	11a, 15a

mas também para representantes da espécie *Sida acuta carpinifolia*. Por outro lado plantas sadias da espécie *Sida rhombifolia* são suscetíveis a uma infecção, não só a partir de pés doentes da mesma espécie, mas também de outras espécies de *Sida*, tais como *Sida acuta carpinifolia* e *Sida cordifolia*. Verificamos, assim, uma transmissibilidade recíproca do virus da "clorose infecciosa" entre diversas espécies do gênero *Sida*. Surge pois, como problema preponderante, o de se o virus encontrado na natureza, em plantas doentes destas diversas espécies é, de fato, idêntico. Para poder resolver esta questão, vamos comparar, primeiro, a velocidade com que o virus passa do componente doente para o sadio, nas diversas combinações de enxertias. Depois, resta-nos averiguar se o quadro dos sintomas da "clorose infecciosa", exibido pelas diversas espécies de *Sida*, possibilita uma eventual diferenciação dos respectivos agentes causadores.

A) Velocidade da passagem do virus da "clorose infecciosa" entre os componentes das combinações homo — e heteroplásticas do gênero *Sida*.

Como já foi exposto no capítulo 3, I C, ha muitos fatores que, nas enxertias, exercem influência na velocidade da transmissão do virus da "clorose infecciosa". Assim, não se pode estranhar que até plantas da mesma combinação de enxerto e cavalo apresentem, sob a influência de diversos fatores esternos, grandes diferenças na velocidade da transmissão do virus.

Já apontamos como fatores parcialmente responsáveis por tais diferenças de velocidade da transmissão: temperatura ambiente, iluminação, vigor da planta ou abundância de folhas no componente doente, gráu do pegamento, duração do contáto entre enxerto e cavalo, e método de enxertia. Todos esses e muitos outros fatores ainda influiram, com certeza, no resultado das experiências referidas na tabela 4. Mesmo assim, devemos tentar averiguar se, não obstante as variações causadas por todos estes fatores, as combinações de enxertias anotadas na tabela 4 diferem entre si no tocante á velocidade da transmissão do virus.

Acerca da avaliação da velocidade de transmissão do virus da "clorose infecciosa" do enxerto doente para o cavalo sadio, em enxertias homoplásticas do tipo garfagem nas espécies *Sida acuta carpinifolia* e *Sida rhombifolia* (tab. 3, ensáios 1-d, 2-a, 3, 5-a, 14-a, 23-c e tab. 4 ensáios 8-a, 15-a, 17-a), podemos dizer que são pouco acentuadas as diferenças, quanto ao período de incubação, entre as duas espécies. A passagem mais rapida do virus para o componente sadio foi observada na espécie *Sida rhombifolia* no ensáio n. 17-a (tab. 4), onde,

já depois de 13 dias da enxertia, notaram-se sintomas de doença no cavalo antes sadio. O valor mínimo do período de incubação observado nas nossas experiências na espécie *Sida acuta* foi de 14 dias (ensáio 23-c, tab. 3). A-pezar-de muito pequena essa diferença parece indicar que na espécie *Sida rhombifolia* a passagem do virus do enxerto doente para o cavalo sadio se realiza com velocidade ligeiramente maior do que na espécie *Sida acuta carpinifolia*. De fato, encontramos muito raramente, nos nossos ensáios com a espécie *Sida rhombifolia*, casos de passagem bastante demorada do virus, o que é relativamente frequente na espécie *Sida acuta carpinifolia* (tab. 3, 1-d, 5-a, 7, 23-c). Para podermos focalizar melhor essas diferenças, reunimos, na tab. 5 alguns valores correspondentes ao período médio de incubação, computados de todos os ensáios comparáveis entre si e realizados com as diversas combinações de enxertias.

TABELA 5

Número médio de dias até o aparecimento dos sintomas

Em plantas inicialmente sadias de	Após enxertia com fontes doentes de:					
	Sida acuta		*Sida rhomb.*		*Sida cordifolia*	
	N.º médio de dias (com erro standard)	N.º de variantes	N.º médio de dias (com erro standard)	N.º de variantes	N.º médio de dias (com erro standard)	N.º de variantes
Sida acuta (cavalo) . .	39,34 ± 3,24	33	45,8 ± 15,7	5	—	
Sida rhombifolia (cavalo)	48,87 ± 6,58	16	31,1 ± 7,52	11	23 ± 8,27	5
Sida acuta (enxerto) . .	54 ± 6,02	2	52 ± 5,52	5	—	

Convem frizar, inicialmente, que devido à grande variação da velocidade de transmissão, já entre plantas da mesma combinação, as diferenças entre os números relativos a diversas combinações de enxertias não são, estatisticamente, significativas. Mesmo assim os dados reunidos na tabela 5 nos permitem tirar algumas conclusões interessantes. De acordo com as indicações dessa tabela, a passagem do virus da "clorose infecciosa", do enxerto doente para o cavalo originalmente sadio se efetua, nas enxertias homoplásticas de *Sida rhombifolia*, com maior rapidez média do que nas ligações correspondentes de *Sida acuta* (31, 1 e 39, 34 dias), resultado que confirma as nossas observações anteriores. Para explicar esse fato, não acreditamos que se deva admitir a existência de diversos virus nas duas espécies. Basta considerar as diferenças anatômicas, especialmente do sistema condutivo entre duas espécies, para compreender que tambem o mesmo virus, em diferentes espécies, é transportado com desigual velocidade.

Passando agora à comparação dos valores referentes à velocidade, com que cavalos sadios de *Sida acuta* são infeccionados a partir de componentes homoplásticos e heteroplásticos de enxertias, pode-se verificar, da nossa tabela, uma nítida superioridade na rapidez da transmissão do virus para o enxerto da própria espécie. (39,34 e 45,8 dias).

Também para cavalos sadios da espécie *Sida rhombifolia* o virus passou, em média, num lapso de tempo mais curto, a partir de enxertos doentes da própria espécie, do que dos de *Sida acuta carpinifolia* (31,1 e 48,78 dias).

Esses resultados mostram que geralmente a condução do virus é efetuada com maior rapidez entre componentes de enxertias homoplásticos, do que entre heteroplásticos. Isso quer dizer que se deve atribuir ás enxertias homoplásticas uma posição excepcional com relação à passagem do virus. Assim, ao nosso ver, não há necessidade de admitir a existência de mais de um agente causador da "clorose infecciosa" nas duas espécies de *Sida* estudadas. Ao contrario, achamos poder concluir desses exemplos, que a facilidade da transmissão do virus depende mais da velocidade e do gráo de pegamento entre os componentes de uma enxertia, do que da natureza do próprio virus. Sendo geralmente mais facil e perfeito o pegamento das enxertias homoplásticas, não é de extranhar a marcada rapidez de transmissão do virus entre os componentes de tais enxertias. Esta idéia tambem não fica em desacordo com o fato de cavalos sadios de *Sida rhombifolia,* enxertados com *Sida cordifolia,* se infeccionarem após um menor período de incubação do que os enxertados com garfos da própria espécie. Podemos, talvez, supôr que a estrutura anatômica de *Sida cordifolia* seja especialmente favoravel a um transporte rápido do virus. Infelizmente faltam-nos experiências com enxertias homoplásticas de *Sida cordifolia,* que possam provar que a passagem do virus do enxerto doente para o cavalo sadio nelas se efetua ainda com maior rapidez do que nas enxertias heteroplásticas. Por outro lado, o pegamento dos enxertos desta espécie com os cavalos da espécie *Sida rhombifolia* foi ótimo nos poucos ensáios que pudemos realizar, de maneira que não precisamos admitir que nestas enxertias a zona de ligação constituiu, durante muito tempo, um obstáculo para a passagem do virus. Achamos, por isso, todos os resultados relativos à velocidade de transmissão do virus entre os componentes de enxertias de diversas combinações de *Sida,* compatíveis com a teoria de que as espécies estudadas contêm o mesmo virus; é verdade, porem, que, na planta, o virus é conduzido com uma velocidade dependente das peculiaridades ana-

tômicas da espécie e também do gráo de pegamento dos componentes das enxertias.

Limitamos de propósito esta discussão da relação existente entre a rapidez da transmissão do virus e a natureza da combinação de enxertias, ao caso da passagem do virus do enxerto doente para o cavalo sadio. Os nossos ensáios sobre o caso inverso, isto é, a passagem do virus do cavalo doente para o enxerto sadio compreendem ainda tão escasso material, que não queremos tirar deles conclusões gerais. Os resultados, porem, dos poucos ensáios que pudemos realizar, também não estão em contradição com a hipótese de que as diversas espécies estudadas de *Sida* contenham o mesmo virus.

B) Comparação dos sintomas exibidos por cavalos da mesma espécie, infeccionados com virus transmitido por enxertos de diferentes espécies.

Para poder decidir a questão de existirem ou não, diferenças entre os agentes causadores da "clorose infecciosa" das diversas espécies de *Sida*, é necessário observar, com todas as minúcias, o tipo de sintomas, que se manifesta em cavalos de uma espécie após o contáto por enxertia com plantas doentes de diversas espécies de *Sida*. Desta maneira, poder-se-á averiguar se o virus encerrado pelas 3 espécies estudadas de *Sida* e transmitido para diversas plantas de uma única espécie, produz nelas sintomas que revelam a origem do virus. Precisamos, porem, antes de efetuar tais estudos, verificar se os sintomas da "clorose infecciosa", apresentados em condições naturais, respectivamente pelas espécies *Sida acuta carpinifolia*, *Sida rhombifolia* e *Sida cordifolia*, são de fato diferentes. Devido à grande variação dos sintomas, já em indivíduos da mesma espécie, não é muito facil chegar, nesta questão, a uma conclusão definitiva. Acreditamos, porem, que a descrição dos sintomas, que demos na pag. 105, da "clorose infecciosa", de *Sida acuta*, se adapta tambem ao quadro da "clorose infecciosa", apresentado por *Sida rhombifolia* e *Sida cordifolia*. Encontramos, nas folhas das 3 espécies, as manchas cloróticas — ora mais brancas ora mais amarelas — de contorno angular, localizadas de preferência nos ângulos formados pelas nervuras secundárias com a nervura principal, e limitadas, extensamente, pelas próprias nervuras. Encontramos tambem, nas folhas novas recem-infeccionadas, das 3 espécies, um acentuado esclarecimento das nervuras.

Queremos crer, por outro lado, que as 3 espécies são afetadas, em gráo diferente, pela "clorose infecciosa".

A espécie *Sida cordifolia* é, conforme as nossas observações, a menos alterada pela doença. Nesta espécie, as manchas cloróticas das

folhas não passam, geralmente, de um certo tamanho, de maneira que grande parte do limbo costuma conservar a coloração verde normal. Alem disso, não pudemos observar, nesta espécie, nenhum enrugamento ou enrolamento das folhas doentes. A densa cobertura pilosa da superfície das folhas desta espécie contribue para velar ainda mais os sintomas da doença. (Estampa 12, fig. *C.*).

Na espécie *Sida acuta carpinifolia,* os sintomas são frequentemente mais acentuados do que na espécie *Sida cordifolia.* Nas folhas doentes da espécie *Sida acuta carpinifolia* observa-se bem o carater angular das manchas. Como mostra a nossa fotografia (Est. 12, Fig. *D*), as manchas cloróticas iniciam-se nesta espécie, com grande frequência, perto da nervura principal, alastrando-se depois numa faixa de tecido limitada por duas nervuras secundárias, sem atingir, porem, a parte marginal desta faixa, separada do resto por uma nervura terciária. Estas manchas, apezar de grandes, apresentam-se muitas vezes de tonalidade apagada, pouco diferenciada da do resto do limbo.

Geralmente as folhas doentes desta espécie conservam também a sua forma normal, sem apresentar um pronunciado enrugamento e enrolamento.

E justamente estes últimos sintomas marcantes se observam, às vezes, em plantas de *Sida rhombifolia* no decurso de graves infecções de "clorose infecciosa". As folhas normais desta espécie, sendo já de menores dimensões, ficam, muitas vezes, após a infecção ainda mais reduzidas no tamanho, e apresentam a superfície enrugada e ondulada. Em tais folhas as zonas claras ocupam uma área muito mais extensa do que as zonas escuras. Nesta espécie, porém, também ha casos de doença em que as folhas, conservando o seu aspecto geral, só se acham salpicadas de pequenas manchas cloróticas. Como regra, entretanto, as plantas desta espécie mostram-se seriamente afetadas pela "clorose infecciosa" (Estampa 13, fig. *E*).

Vamos ver, agora, se no processo de passagem do virus para os componentes sadios da enxertia se reproduz neles o tipo de sintoma característico da espécie de onde o virus proveiu. Referindo-nos, primeiro, a *Sida rhombifolia,* não podemos, absolutamente, observar uma influência da espécie do enxerto doente no quadro sintomatológico apresentado pelo cavalo. Só queremos citar aqui o exemplo da nossa experiência n.º 15-b de 29-12-42.

Esta experiência consistiu em enxertar, em cavalos sadios de *Sida rhombifolia,* enxertos doentes de *Sida cordifolia,* espécie esta afetada de maneira branda pela "clorose infecciosa". Mesmo assim os cavalos, antes sadios, de *Sida rhombifolia,* infeccionaram-se com sinto-

mas graves da "clorose infecciosa", não distinguiveis dos apresentados por cavalos que tinham sido ligados com enxertos da própria espécie *Sida rhombifolia.*

Não podemos verificar porem, em *Sida acuta carpinifolia,* a mesma independência com relação ao gráo de desenvolvimento dos sintomas, da espécie do enxerto fornecedora do virus. Naquela espécie é inegavel a existência de uma estreita relação entre a espécie de planta que transmite o virus e a gravidade dos sintomas que adquire o componente da enxertia, antes sadio.

A figura *G* da estampa 14 mostra dois ramos laterais de plantas originalmente sadias de *Sida acuta* var. *carpinifolia,* que tinham sido enxertadas, em 21-12-42 com enxertos doentes, respectivamente de *Sida rhombifolia* e de *Sida acuta carpinifolia.* Na fotografia, tirada 9 mêses mais tarde, pode-se verificar que os sintomas exibidos pelo cavalo da enxertia homoplástica são muito mais acentuados do que os do cavalo heteroplástico. O virus que passou de *Sida rhombifolia* para *Sida acuta* produziu, pois, nesta última espécie, sintomas bastante apagados.

Deve-se frizar agora que o caso documentado pela nossa figura *G* da estampa 14 não constitue uma exceção, mas que em todos os nossos ensáios os cavalos de *Sida acuta,* enxertados com caules doentes de *Sida rhombifolia,* adquiriram apenas um tipo brando da doença. Para melhor ilustrar, apresentamos ainda as fotografias de duas enxertias executadas no curso de outros ensáios. (Estampa 14, fig. *H* e est. 15, fig. *I*). Num dos casos (fig. *H*), passou do broto doente de *Sida acuta,* cujas folhas se caracterizavam por um esclarecimento acentuado das nervuras, um virus que provocou nas folhas do cavalo homoplástico os mesmos sintomas fortes. No outro caso, porem, representado por uma enxertia heteroplástica (fig. *I*), os sintomas apresentados pelo cavalo de *Sida acuta carpinifolia* são muito menos pronunciados do que os exibidos pelo enxerto de *Sida rhombifolia.*

Consideramos até agora apenas o caso da transmissão do virus do enxerto doente para o cavalo sadio. Observa-se, porem, no caso inverso, a mesma aparência apagada dos sintomas no componente da enxertia, antes sadio, isto é em ramos de *Sida acuta* enxertados sôbre pés seriamente infeccionados de *Sida rhombifolia.* Um exemplo deste tipo de enxertia representa a nossa figura *J* da estampa 15, na qual se vê bem o caracter brando das manchas cloróticas exibidas pelas folhas do enxerto, formando um verdadeiro contraste com a nitidez dos sintomas das folhas de *Sida rhombifolia.*

Podemos pois resumir estas observações frizando que o virus transmitido, para plantas de *Sida acuta carpinifolia,* de pés doentes de

TABELA 6

Ensáios de transmissão da "clorose infecciosa" nas enxertias com *Abutilon*

N.º da experiência	Data da experiência	Combinação de enxertias	Método de enxertia	N.º de enxertos pegados com transmissão da doença	sem transmissão da doença	N.º de enxertos não pegados	Período de incubação em dias	Período médio de incubação	Comparação com os ensáios da Tab. 2 e 4, números:
15c	29 - 12 - 42	*Abut. spur.* doente sôbre *Abut. str.* sadio	garfagem	1	1		24		2a, 3, 17a
15d	29 - 12 - 42	*Abut. spur,* sem sint. sôbre *Abut. str.* s.	garfagem		1				
16b	19 - 1 - 43	*Abut. spur.* sem sint. sôbre *Abut. spur.* d.	garfagem	1	3		157		
16a	19 - 1 - 43	*Abut. str.* s. sôbre *Abut. spur.* d. . . .	garfagem	1			29		
24a	17 - 6 - 43	*Abut. str.* s. sôbre *Abut. spur.* d. . . .	garfagem	2	1	1	46, 86	66	1c
22a	15 - 6 - 43	*Sida rh.* d. sôbre *Abut. str.* s.	garfagem			1			
22b	15 - 6 - 43	*Sida ac.* d. sôbre *Abut. str.* s.	garfagem			1			
19a	15 - 3 - 43	*Sida rh.* s. sôbre *Abut. sp.* d. sem sint. .	garfagem			2			
8c	19 - 10 - 42	*Abut. sp.* d. sôbre *Sida rh.* s.	garfagem	7	1		21, 27, 31, 39 53, 57, 65	41, 86 ± 5, 84	8a, 17a, 9, 10, 11a, 15b
8b	19 - 10 - 42	*Abut. spur.* s.s. sôbre *Sida rh.* s.	garfagem		2				
13a	7 - 12 - 42	*Abut. spur.* d. sôbre *Sida ac.* s.	garfagem	1	2	1	37		
14c	21 - 12 - 42	*Abut. spur.* d. sôbre *Sida ac.* s.	garfagem	4	1		41, 41, 41, 98	55, 25 { 51, 6 ± 10, 42	1e 4, 14b, 17b, 5a
12	17 - 11 - 42	*Abut. str.* s. sôbre *Sida rh.* d.	garfagem		2	1			
13b	7 - 12 - 42	*Abut. spur.* s.s. sôbre *Sida rh.* d. . . .	garfagem		4	1			
20b	2 - 4 - 43	*Abut. spur.* s.s. sôbre *Sida rh.* d. . . .	garfagem	1	1		160		
20c	2 - 4 - 43	*Abut. str.* s. sôbre *Sida rh.* d.	garfagem	1	1		47		1g, 20a
23b	16 - 6 - 43	*Abut. str.* s. sôbre *Sida rh.* d.	garfagem		3	1			
23a	16 - 6 - 43	*Abut. str.* s. sôbre *Sida ac.* d.	garfagem		1				

Sida rhombifolia, provoca nas folhas da primeira, sintomas de um caracter muito mais atenuado do que o virus adquirido de componentes doentes da própria espécie. Às possiveis explicações para este fenômeno vamos nos referir na parte da discussão.

III) Resultados de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio de enxertias realizadas entre representantes dos gêneros *Abutilon* e *Sida.*

Na tabela 6 acham-se reunidos os resultados de todas as observações que se referem às enxertias em que pelo menos um componente pertencia ao gênero *Abutilon.*

Já de um exame superficial desta tabela se pode inferir que o virus causador da "clorose infecciosa" da nossa variedade de *Abutilon* passa com relativa facilidade, não só para plantas sadias do mesmo gênero, como tambem para as de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia.* A transmissão inversa, porem, isto é, a passagem do virus de *Sida* doente para *Abutilon* sadio, efetua-se apenas em condições excepcionais. Entendemos aqui como plantas sadias de *Abutilon* unicamente as pertencentes à forma tipica da espécie *Abutilon striatum* DICKS, reservando para ulterior consideração o caso dos pés de *Abutilon spurium* "sem sintomas" e que apresentam o aspecto de plantas sadias.

Devemos verificar agora, focalizando mais detalhadamente alguns resultados destes ensáios, se as nossas observações da tab. 6 estão de acordo com a suposição de que os agentes causadores de "clorose infecciosa" em *Sida* e em *Abutilon* são idênticos.

Iniciando a apreciação da tabela 6, queremos destacar alguns dados referentes à *velocidade* da transmissão do virus. Pode-se concluir, com efeito, que os respectivos valores para os gêneros *Sida* e *Abutilon* são demasiadamente semelhantes para justificar uma separação dos virus (1). Em enxertias homoplásticas de *Abutilon* pudemos observar o aparecimento dos primeiros sintomas no enxerto antes sadio, após um lapso médio de tempo de 53,66 ± 17,76 dias, valor este perfeitamente comparavel ao de 54,0 ± 6,02 (veja tab. 3 e 5), calculado para a passagem do virus no sentido acropetal em enxertias homoplásticas de *Sida acuta carpinifolia.* A transmissão do virus do enxerto doente para o cavalo sadio em enxertias heteroplásticas de *Abutilon spurium* sobre *Sida rhombifolia,* efetuou-se até com maior rapidez do que em enxertias compostas de enxertos de *Sida acuta* e de cavalos de *Sida rhombifolia* (41,86 dias e 48,87 dias). É verdade que a passagem do virus de *Abutilon* para a espécie *Sida acuta carpinifo-*

(1) Também neste caso, as diferenças entre as médias de velocidade de transmissão do virus em enxertias de *Sida* e de *Abutilon,* não são, estatísticamente, significativas.

lia levou, comparativamente, mais tempo (em média 51.6 dias). Isso se deve, porem, provavelmente, mais ao fato de terem ficado, nos primeiros dias, despercebidos os sintomas nesta espécie, por serem extremamente brandos. Assim, todas as indicações da tabela 6, relativas à velocidade da transmissão do virus, combinam com a hipótese de que não haja diferença fundamental entre os virus causadores da "clorose infecciosa" em *Sida* e em *Abutilon*.

Passando em seguida à comparação dos *sintomas* desta doença apresentados por plantas de *Sida* e de *Abutilon*, é inegavel que o carater angular dos sintomas é o mesmo, em plantas atacadas, dos dois gêneros. Por outro lado, deve-se frizar que os sintomas exibidos pelas duas variedades de *Abutilon* incluidas neste trabalho são mais brandos do que os observados nas plantas infeccionadas de *Sida* (Estampa 13, fig. *F*). Em *Abutilon* geralmente as manchas claras compreendem apenas áreas reduzidas e só nas folhas novas é que são bem visiveis. Em folhas velhas as manchas claras caracterizam-se por uma tonalidade verde que pouco difere da tonalidade normal das folhas. Esta descrição se refere principalmente ao quadro sintomatológico observado em *Abutilon spurium*. Nas plantas experimentalmente infeccionadas, de *Abutilon striatum* (Estampa 16, fig. *K*), as manchas cloróticas chamam mais a atenção, devido ao maior enrugamento e encrespamento que a doença provoca nas folhas desta espécie, e tambem por causa da maior hiperplasia, nesta espécie, das áreas que conservam a tonalidade de côr normal. Todas estas diferenças são, porem, ao nosso ver, de carater puramente quantitativo.

Admitindo, assim, que não há diferença fundamental no tipo dos sintomas entre os genêros *Sida* e *Abutilon*, vamos verificar agora quais são os sintomas provocados em *Sida* pelo virus transmitido por *Abutilon*.

Referindo-nos, em primeiro lugar, aos sintomas provocados por virus de *Abutilon* em *Sida rhombifolia*, o nosso ensáio de 19-10-42 nos convenceu de que eles em nada diferem dos produzidos por virus originário da própria espécie *Sida rhombifolia*. Apezar dos enxertos terem exibido, neste ensáio, apenas sintomas muito brandos, as manchas cloróticas apresentadas após a passagem do virus pelas folhas do cavalo eram muito acentuadas, compreendendo, frequentemente, a totalidade da área das folhas. Na realidade, as plantas de *Sida rhombifolia*, infeccionadas a partir de fócos de *Sida* e de *Abutilon*, não podiam ser distinguidas unicamente pelo carater dos sintomas.

O mesmo não se pode afirmar, porem, com relação aos sintomas provocados por virus de diferentes origens em plantas de *Sida*

acuta carpinifolia. Já por ocasião da discussão da tabela 4 tentamos evidenciar que o virus transmitido para *Sida acuta* a partir de *Sida rhombifolia,* e mesmo exemplares gravemente infeccionados desta última espécie, produz nessa espécie sintomas apenas brandos da "clorose infecciosa". Substituindo agora, na qualidade de planta fornecedora do virus, *Sida rhombifolia* por *Abutilon spurium,* o caráter dos sintomas apresentado pelas plantas de *Sida acuta* atinge ainda um gráo mais atenuado. Vemos ilustrado este fato pela nossa figura *L* da estampa 16 que mostra, lado a lado, uma haste de uma enxertia homoplástica de *Sida acuta* e uma de um porta-enxerto da mesma espécie, enxertado com um garfo de *Abutilon spurium* doente. Os sintomas da doença no cavalo desta última planta não são, praticamente, reconheciveis. De fato tivemos, ás vezes, dificuldade em decidir se plantas de *Sida acuta,* que tinham sido enxertadas com garfos de *Abutilon spurium,* apresentavam ou não sintomas de doença. Essa dificuldade surgiu, por exemplo, nos ensáios Ns. 13-a e 14-a efetuados respectivamente em 7 e 21-12-1942.

Em 5 plantas destas séries apareceram manchas cloróticas muito apagadas, que consideramos, primeiro só com certa reserva, como sintomas da "clorose infecciosa". Para atalhar a esta dúvida, enxertamos, em 15-3-43, (ensáio 19-b, Tab. 4) brotos de todas estas plantas em cavalos sadios de *Sida rhombifolia,* onde vimos se desenvolver, após o período de incubação, sintomas bastante acentuados da "clorose infecciosa". Ficou provado dessa maneira que o virus passa sem dificuldade, de *Abutilon spurium,* para *Sida acuta carpinifolia.* Apenas a reação que o virus proveniente de *Abutilon* provoca em *Sida acuta* é comparativamente mais fraca. Voltaremos a este assunto na discussão geral dos resultados deste trabalho.

Uma objeção mais séria do que a apenas exposta para a hipótese da identidade dos virus causadores da "clorose infecciosa" em *Sida* e em *Abutilon* é constituida pela grande dificuldade da transmissão do virus para plantas sadias de *Abutilon.* Esta qualidade contrasta seriamente com a garantia quasi matemática, com a qual se pode provocar, por meio de enxertia, uma infecção de plantas de *Sida* com o virus da "clorose infecciosa". Nas nossas experiências verificou-se esta dificuldade de provocar sintomas em *Abutilon striatum* mesmo em enxertias onde serviu de fóco de infecção a própria espécie de *Abutilon spurium.* Podemos citar como exemplos deste comportamento os resultados dos ensáios 16-a e 24-a, realizados em 19-1 e 17-6-1943. No primeiro destes ensáios observamos, já 29 dias após a enxertia, o aparecimento dos primeiros sintomas no enxerto de *Abutilon striatum* li-

gado a um cavalo bem doente de *Abutilon spurium* (fig. *K*). Mas em contradição com tudo o que observamos nas experiências antecedentes, os sintomas ficaram completamente restritos a esta única folha: as folhas sucessivas desenvolveram-se de maneira normal, sem exibir o menor sinal de doença. Tambem nos dois casos de infecção positiva do ensáio análogo, efetuado em 17-6-43, os sintomas manifestados no enxerto ficaram durante muito tempo restritos a uma folha de cada vez. Mais tarde evoluiram tambem sintomas nas folhas mais novas, mas não passaram de pequenas manchas cloróticas, muitissimo apagadas. Assim, não é de extranhar que o aparecimento de sintomas em enxertias heteroplasticas de *Abutilon* pôssa ser observado ainda mais raramente. Só tivemos ocasião de acompanhar um único caso de passagem do virus de um cavalo doente de *Sida rhombifolia* para um enxerto de *Abutilon striatum*, caso anotado no ensáio N.º 20-c realizado em 2-4-43. Neste caso apareceu, 47 dias depois da enxertia, numa folha do enxerto, uma única mancha clorótica. Essa mancha ficou, durante algumas semanas, bem visivel, para tornar-se mais tarde pouco distinta do resto do limbo. Tambem nas outras folhas não se manifestaram sintomas da "clorose infecciosa".

Quanto à significação dessas observações para a validade da nossa hipótese da provavel identidade do virus causador da "clorose infecciosa" em *Sida* e em *Abutilon*, achamos que estes resultados em nada modificam o nosso ponto de vista. A nosso vêr a maneira relutante na manifestação de sintomas é uma peculiaridade do nosso material de *Abutilon striatum*, que caracteriza a planta hospedeira, mas não o virus. Já sabemos, das abundantes indicações da literatura referentes a outras doenças de virus, que há sempre pronunciadas diferenças de suscetibilidade a um determinado virus, mesmo entre as espécies hospedeiras a ele sensiveis. Ao passo que certas espécies demonstram a presença do virus pela exibição de sintomas, outras agem como portadoras ("carriers"), não manifestando indícios da infecção ocorrida, apezar de encerrarem o virus. Pode ser que a nossa variedade de *Abutilon striatum* se comporte, em relação ao virus da "clorose infecciosa", parcialmente como um "portador". Resta tambem a possibilidade de que ela de fato possua certo gráo de resistência contra o virus. A decisão desta questão depende do resultado de outras experiências, ainda em andamento. Em todo caso, essa discrepância na suscetibilidade de várias espécies e gêneros, ao virus da "clorose infecciosa" não constitue na virologia um novo fenômeno, nem nos obriga a admitir que existam, entre os virus provenientes de *Sida* e de *Abutilon*, diferenças fundamentais.

Tendo discorrido sobre as diferenças de suscetibilidade, que várias espécies costumam demonstrar a um determinado virus, podemos esperar que se torne mais compreensivel o caso das plantas de *Abutilon spurium* "sem sintomas", cuja discussão deixamos de fazer á pagina 139 atraz. Já explicamos anteriormente, que devemos a obtenção destas plantas ao acaso. Nas nossas culturas de plantas cloróticas de *Abutilon spurium* apareceram 2 ou 3 pés que não manifestavam sintomas. Num outro pé, de hastes bifurcadas, verificamos sintomas só nas folhas de uma haste, ao passo que as da outra não exibiam sintomas. Subdividimos uma parte dos caules das plantas aparentemente sadias em diferentes pedaços, multiplicando assim as plantas por estacas. Não observamos, nem nas plantas originais, nem nas obtidas das estacas, um único caso de aparecimento espontâneo de sintomas. Não conhecendo a origem verdadeira dessas plantas "sem sintomas", de *Abutilon spurium*, não podemos dizer, sem a prévia realização de experiências, se devemos considera-las:

1) como plantas não infeccionadas, suscetiveis á infecção;
2) como plantas infeccionadas pertencentes ao grupo dos "carriers" e não suscetiveis a nova infecção com o mesmo virus;
3) como plantas "recuperadas" totalmente ou parcialmente de uma infecção, apresentando certo gráo de resistencia contra o virus.

Os ensáios 15-d e 8-b realizados com as plantas deste tipo em 29-12-42 e em 19-10-42 levaram-nos a admitir que as plantas não pertencem à segunda categoria; tiramos esta conclusão do fato de não se ter verificado nas enxertias delas com plantas sadias de *Abutilon striatum* e com *Sida rhombifolia*, uma transmissão de um virus causador da "clorose infecciosa" para os cavalos sadios.

Por outro lado, não acreditamos também que estas plantas "sem sintomas" de *Abutilon spurium*, pertençam á categoria das plantas perfeitamente suscetiveis, isto é, à mesma categoria dos nossos exemplares de *Abutilon striatum* (categoria 1). Contrariam esta hipótese a dificuldade e lentidão com que essas plantas se infeccionam, mesmo em contáto com os pés doentes da mesma espécie. (Ensáio 16-b de 19-1-43).

Achamos que todos os resultados das nossas observações podem ser explicados da maneira mais satisfatória possivel, aceitando-se a terceira das hipóteses (categoria 3), isto é, atribuindo a essas plantas certo gráo de resistência à infecção, resistência essa adquirida pela "recuperação" de um ataque anterior, da mesma doença.

Assim se explica que na maioria dos casos as plantas continuavam não apresentando sintomas, mesmo quando enxertadas sobre plan-

tas distintamente doentes, de *Abutilon spurium* ou de *Sida rhombifolia*. Nos dois únicos casos, porem, nos quais se evidenciou uma infecção dessas plantas, os sintomas da doença só começaram a manifestar-se 5 mêses depois das enxertias (Estampa 17, fig. *M*).

Comparando, assim, o lapso de tempo necessário para a infecção das plantas "sem sintomas" de *Abutilon spurium* e de *Abutilon striatum*, pode-se dizer que o aparecimento dos sintomas nestas últimas se efetua, em condições iguais, com uma velocidade 4 e até 5 vezes maior do que nas primeiras.

Ante o grande interesse que oferece o estudo de todas as questões ligadas ao problema da resistência das plantas às doenças de virus, consideramos o estoque destas plantas de *Abutilon spurium* "sem sintomas", como material muito util para futuras pesquisas.

IV) Resultados negativos de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por enxertia entre representantes de outros gêneros de malváceas.

Fizemos repetidas tentativas para transmitir o virus da "clorose infecciosa" por meio de enxertia para plantas de *Pavonia* sp., *Hibiscus sinensis* e *Gossypium herbaceum*.

Devido à grande importância econômica do algodoeiro no nosso país e à possível relação existente entre o "mosaico do algodoeiro" e a "clorose infecciosa" das malváceas, insistimos especialmente nas experiências com *Gossypium*. Com efeito, enxertamos sobre cavalos sadios de algodoeiro garfos doentes, respetivamente de *Sida rhombifolia, Sida acuta* e *Abutilon spurium*. A maioria dessas enxertias não pegou. Tres dos enxertos de *Abutilon spurium* se mantiveram vivos durante alguns mêses, sem que tivessemos observado, nos cavalos, sintomas patentes da doença. Pretendemos repetir essas experiências, para averiguar se o algodoeiro se comporta como planta portadora de virus.

Quanto a outras possiveis plantas hospedeiras da "clorose infecciosa" das malváceas, achamos no próprio terreno do Instituto Biológico, ao lado de plantas doentes de *Sida cordifolia*, pés de *Waltheria americana* L. apresentando manchas angulares muito semelhantes às típicas da "clorose infecciosa" (Estampa 17, fig. *N*). Ensáios de transmissão experimental com esta espécie não foram ainda executados.

Encontramos, alem disso, nos arredores de São Paulo e de Campinas, plantas de *Pavonia* sp. e de *Hibiscus esculentus* cujas folhas apresentavam sintomas possivelmente provocados pela infecção de um virus. Em vista desses sintomas consistirem mais em um enrugamen-

to das folhas do que numa clorose definida, não acreditamos na existência de uma relação estreita entre essas doenças e a "clorose infecciosa" das malváceas.

DISCUSSÃO

Não podemos entrar aqui na apreciação detalhada de todos os resultados deste trabalho, sôbre os quais existem controvérsias na literatura, ou que merecem, por outras razões, elevado interesse. Entre as questões que não podemos abordar aqui minuciosamente queremos mencionar, por exemplo, a passagem do virus da "clorose infecciosa" do enxerto para o cavalo, em casos em que o garfo não pegou ou foi intencionalmente removido. Outro fato digno de ser posto em destaque é a não transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" no gênero *Sida*, por sementes, contrastando, ao que parece, com a transmissibilidade do virus da mesma doença, por sementes, no gênero *Abutilon*. Finalmente não queremos deixar de mencionar aqui, se bem que apenas de passagem, a influência exercida pelo tratamento de enxertos infeccionados, com temperaturas elevadas, sôbre a velocidade da transmissão do virus para os cavalos sadios. Deixando todas essas questões de lado, vamos restringir a discussão a algumas questões relacionadas com o problema da resistência congênita ou adquirida, das plantas hospedeiras, ao virus da "clorose infecciosa".

a) Surge, em primeiro lugar, a questão de se aqueles ramos de plantas doentes, que não chegam a exibir sintomas da doença, devem ser considerados suscetíveis ou resistentes ao virus da "clorose infecciosa".

Já na página 129 tivemos ocasião de nos referir ao fato de que frequentemente, plantas de *Sida*, mesmo quando gravemente infeccionadas com o virus da "clorose infecciosa" terem um ou mais ramos, cujas folhas não apresentam o menor sintoma da doença. Dentro da mesma ordem de idéias falamos tambem da frequente ocorrência de plantas profundamente bifurcadas, de *Sida*, que chamam a atenção pela abundância de sintomas da "clorose infecciosa" exibidos pelas folhas de uma haste, e a falta completa de tais sintomas na outra.

Como já foi exposto na introdução bibliográfica (pag. 108), o mesmo fenômeno observado em plantas doentes do gênero *Abutilon* tinha despertado antes o interesse de vários autores. H. KLEBAHN (11, 1932) e J. Y. KEUR (10, 1934), refutando a opinião dos antigos pesquisadores, afirmam que os ramos que deixam de exibir sintomas, simplesmente escapam à infecção, conservando, dessa maneira, a sua suscetibilidade integral. Para provar essa hipótese, KEUR executou 3 diversos tipos de experiências:

1) Ramos sem sintomas, de plantas doentes, enxertados sôbre cavalos sadios, não transmitiam a doença. Estes ramos — assim concluiu o autor — não contêm, pois, o virus da "clorose infecciosa".

2) O virus de cavalos doentes não passava, através de ramos sem sintomas, para enxertos de plantas suscetíveis. Estas observações confirmam, de acordo com KEUR, os resultados do primeiro tipo de ensáios.

3) Ramos sem sintomas, de plantas doentes, multiplicados por estacas, podiam ser infeccionados se enxertados com garfos contendo o virus do mesmo ou de outros clônes de *Abutilon*. De experiências deste último tipo o autor se serviu para demonstrar a suscetibilidade desses ramos sem sintomas ao virus da "clorose infecciosa".

Trabalhando com o virus da "clorose infecciosa" em *Sida*, achamos interessante averiguar se a teoria de KEUR se ajusta tambem aos casos correspondentes deste gênero. Realisamos, por várias vezes, enxertias de ramos sem sintomas (provenientes de plantas doentes) em cavalos sadios, para verificar, conforme o método empregado por KEUR no primeiro tipo dos seus ensáios, se tais ramos contêm virus e podem transmiti-lo.

Um exemplo de estudos desta natureza é constituido pelas experiências Ns. 11-a e 11-b, executadas em 12-11-42 e anotadas na tab. 4. Os 9 garfos que enxertamos, na referida data, em plantas sadias de *Sida rhombifolia*, originaram-se do mesmo pé de *Sida acuta carpinifolia*. Este pé, caracterizado por uma bifurcação das hastes situada perto do colo da planta, tinha sido enxertado, 8 mêses antes, na extremidade de uma das hastes, com um garfo de uma planta doente de *Sida acuta*. Dentro destes 8 mêses só as folhas da haste enxertada chegaram a exibir sintomas da doença, ao passo que as inseridas na outra haste, que ficou alem da bifurcação, conservavam o seu aspeto normal. A nossa experiência de 12-11-42 consistia justamente em tirar, ao mesmo tempo, 5 pontas de ramos laterais da haste sem sintomas e 4 pontas correspondentes da haste nitidamente doente, e em enxertar cada um desses garfos em uma planta sadia de *Sida rhombifolia*. O resultado destas experiências vem confirmar as observações de J. Y. KEUR. Ao passo que os garfos provenientes da haste nitidamente doente transmitiram facilmente a doença para cavalos sadios (11-a), os 5 garfos retirados da mesma planta, porem da haste que não apresentava sintomas da doença (11-b), não provocaram, absolutamente, o aparecimento de sintomas nos cavalos suscetíveis. A haste sem sinto-

mas, da nossa planta fornecedora dos garfos, não continha, pois, virus, pelo menos em concentração bastante elevada para infeccionar plantas suscetíveis.

Realizamos ainda experiências de cunho semelhante, em 12-3-43. Serviram-nos, para este ensáio, duas plantas de *Sida rhombifolia*, que tinham sido enxertadas, alguns mêses antes, com garfos doentes desta espécie. Em uma destas plantas, o cavalo inteiro, na outra, a parte basal do cavalo, deixou de evidenciar sintomas. Tiramos destes dois cavalos 5 pontas de ramos isentas de sintomas da "clorose infecciosa", enxertando-as em seguida, em plantas suscetíveis de *Sida rhombifolia*. Em nenhuma das plantas enxertadas vimos desenvolver-se o menor sintoma de doença.

Acreditamos, então, ter provado, com estas experiências, que também no gênero *Sida* os ramos de plantas doentes, que deixaram de apresentar sintomas, não contêm, pelo menos em concentração apreciavel, o virus da "clorose infecciosa".

Resta-nos agora verificar se podemos também extender ao gênero *Sida* a segunda conclusão de KEUR, referente à suscetibilidade, para o virus da "clorose infecciosa", dos ramos sem sintomas, de plantas doentes. Um ensáio, comparável aos que KEUR compreende no seu tipo 3, foi por nós executado em 3-1-43. Cortamos, na referida data, de uma planta de *Sida acuta carpinifolia* que numa extremidade da haste profundamente bifurcada mostrava sintomas da "clorose infecciosa", e na outra conservava o aspeto sadio, várias estacas, que cultivamos em caixas de areia. As estacas provenientes da haste doente desenvolveram-se em plantas nitidamente doentes. As estacas da haste sadia deram origem (2) a pés não distinguiveis de outras plantas sadias.

Em 16-6-43 inserimos, em 4 destas estacas aparentemente sadias, garfos bem doentes da mesma espécie. Todas as 4 estacas apanharam a doença "clorose infecciosa". Nas duas estacas, originárias do ramo basal da haste sadia, os primeiros sintomas manifestaram-se em um mês após a enxertia. Nas duas outras estacas, porem, que provieram de um ramo lateral superior da haste sadia, o aparecimento dos primeiros sintomas levou mais de 3 mêses.

Como resultado principal podemos concluir destas observações que, também no gênero *Sida*, os ramos sem sintomas, de plantas doentes, conservam a sua suscetibilidade para o virus da "clorose infecciosa" e devem ser considerados como sendo isentos de virus. Achamos,

(2) Com exceção de um pé, talvez acidentalmente contaminado.

alem disso, interessante a grande diferença na velocidade da infecção entre os ramos, inseridos na planta original, em níveis diferentes. Queremos repetir estas experiências com material mais abundante, para verificar se a essas diferenças de velocidade da contaminação de diversas partes da planta, correspondem diversos gráos de resistência ao virus. Tratar-se-ia, nesse caso, de uma resistência à entrada do virus na referida zona, idéia perfeitamente compativel com a teoria de KEUR.

b) Agora devemos abordar a questão da possibilidade de distinguir diversas variantes do virus da "clorose infecciosa" pela observação dos sintomas desta doença em *Sida*. Desde as pesquisas de W. HERTZSCH (1928) admite-se, na família das malváceas, a existência de dois tipos de "clorose infecciosa". Em plantas infeccionadas com a clorose A, as folhas doentes apresentam manchas amarelas que se extendem, frequentemente, às nervuras; e nas atacadas pela clorose B, distinguem-se, nas folhas, manchas e estrias de um verde pálido, que geralmente não atingem as nervuras. De acordo com HERTZSCH, certas espécies de malváceas são suscetíveis apenas a um desses dois tipos de clorose; outras como por exemplo a espécie *Abutilon striatum*, pode adquirir conjuntamente ambos os tipos.

Nas nossas experiências com plantas do gênero *Sida* verificamos, é verdade, entre plantas doentes da mesma espécie, uma grande variação na extensão das manchas; nas folhas de uma planta de *Sida rhombifolia*, por exemplo, notaram-se, com dificuldade, alguns pontos amarelos, ao passo que nas folhas de uma outra planta da mesma espécie as manchas amarelas ocuparam quasi a totalidade da área das folhas. Mesmo assim, consideramos essas diferenças como sendo de carater mais quantitativo do que qualitativo. Até entre plantas doentes das diferentes espécies de *Sida* e *Abutilon*, que foram incluidas nestes estudos, não pudemos verificar a existência da diferença de carater qualitativo exposta por HERTZSCH. O quadro sintomatológico de todas as plantas doentes, observadas no decurso dos nossos ensáios, corresponde, não obstante as diferenças quantitativas relativas à extensão dos sintomas, ao tipo da clorose, denominado por HERTZSCH "A". O esclarecimento amarelo nas nervuras de 2.ª e 3.ª ordens é, nas nossas plantas doentes, um sintoma primário frequentemente encontrado.

Mesmo assim, tentamos repetidamente dividir em grupos um lote de plantas doentes pertencentes à mesma espécie, de acôrdo com os sintomas apresentados. Indagamos, depois, em ensáios de transmissão por enxertia, se, de fato, os sintomas caraterísticos de cada grupo apa-

recem também nos componentes, antes sadios, das enxertias. O exemplo que citaremos aqui, refere-se à espécie *Sida rhombifolia*. Dividimos (por exemplo no ensáio 17-a de 9-2-43) o lote de enxertos em 3 grupos: nas plantas do primeiro grupo, tornou-se muito patente o esclarecimento das nervuras; nas do segundo as grandes manchas angulares amarelas despertaram mais a atenção; e finalmente, no último grupo, as folhas só exibiram manchas muito pequenas, de um aspeto salpicado. Podemos concluir das nossas observações, que os sintomas: esclarecimento das nervuras e formação de manchas angulares, representam, geralmente, etapas sucessivas do mesmo tipo de doença. Enxertando num cavalo sadio de *Sida rhombifolia* um garfo doente da mesma espécie, com nítidos sintomas de esclarecimentos das nervuras, não conseguimos provocar nele o aparecimento apenas deste sintoma. Ao contrário, o cavalo nunca deixou de apresentar, especialmente nas folhas já expandidas, tambem as manchas angulares, tão características da doença. Quanto à possibilidade de provocar, no cavalo de plantas de *Sida rhombifolia*, sintomas do tipo salpicado, pelo emprego de enxertos da mesma espécie, que manifestavam esse tipo de sintomas, achamos que, de fato, muitas vezes os sintomas do enxerto e do cavalo apresentavam, a esse respeito, grande semelhança. Queremos admitir que neste caso talvez a planta doente se tivesse caracterizado por um teôr relativamente baixo em virus, o que, também no outro componente da enxertia, só permitiu o desenvolvimento de um número reduzido de manchas pequenas. Aliás, também neste caso, nunca se podia falar de uma igualdade absoluta dos sintomas em cavalo e em enxerto. Em todo caso, também estes ensáios não nos levaram a admitir a existência de tipos distintos de "clorose infecciosa" entre as plantas doentes dos gêneros de *Sida* e *Abutilon*.

c) Resta-nos, finalmente, procurar uma explicação para as diferenças do quadro sintomatológico apresentado por plantas de *Sida acuta* var. *carpinifolia*, quando infeccionadas a partir de fócos de diversas espécies.

Démos, no paragrafo 3 II deste trabalho, uma descrição circunstanciada dos sintomas apagados, que se manifestam em plantas de *Sida acuta carpinifolia* após a infecção com o virus da "clorose infecciosa" de *Sida rhombifolia*. Frizamos tambem que esses sintomas velados formaram um contraste patente com os sintomas acentuados que se podem provocar em plantas de *Sida acuta carpinifolia* ao enxerta-las com componentes doentes da própria espécie. Voltámos mais uma vez à esse problema no capítulo 3 III, frizando que os sintomas causados em *Sida acuta carpinifolia* pelo virus transmitido a partir de *Abutilon*

striatum DICKS var. *spurium* LYNCH têm um carater ainda mais brando do que os provocados pelo virus de *Sida rhombifolia* (Estampa 14, Fig. *G* e est. 16, Fig. *L*).

À primeira vista parece que esses sucessivos gráos de intensidade dos sintomas estão relacionados com as diferenças de suscetibilidade das diversas espécies ao virus da "clorose infecciosa". A existência de tais diferenças de suscetibilidade à esse virus, entre diversas espécies e variedades de *Abutilon*, já é conhecida desde a publicação das pesquisas fundamentais, sôbre o assunto, por MORREN, LINDEMUTH e BAUR. Baseando-se nas pesquisas destes autores, E. F. DAVIS organizou uma tabela, atribuindo a cada espécie e variedade de *Abutilon* um determinado gráo de suscetibilidade.

Mas o nosso caso não pode ser explicado apenas pelas diferenças de suscetibilidade entre as espécies. Isso porque, nos nossos ensáios, a mesma espécie apresenta, sob diversas condições, gráos diferentes de suscetibilidade ao virus da "clorose infecciosa", pelo menos se consideramos a expressão dos sintomas como índice da suscetibilidade ao virus.

Na literatura encontramos uma indicação de H. KLEBAHN (11, 1932) que parece ter certa relação com as nossas observações. Referindo-se (11, p. 25) a enxertias de *Abutilon Thompsonii* (doente) sobre *Abutilon Sellowianum* (originalmente sadio) o autor menciona que esta última espécie tem tão grande suscetibilidade (avidez) ao virus, que às vezes parece sugá-lo da outra espécie e concentra-lo nos próprios tecidos. Assim, KLEBAHN atribue às espécies de *Abutilon* diferentes gráos de avidez para o virus, explicando, dessa maneira, o aumento da intensidade dos sintomas em um e a simultânea diminuição da nitidez dos sintomas no outro componente de certas enxertias.

Em parte, essa explicação se pode aplicar tambem ao nosso caso. Achamos possivel que *Sida rhombifolia* atraia o virus com maior avidez do que *Sida acuta carpinifolia* e que, assim, a quantidade de virus que fica disponivel para esta última espécie só chega a provocar nela sintomas brandos. Segundo esta hipótese, a intensidade dos sintomas dependeria, então, da quantidade do virus afluente à planta. Há, porém, alguns indícios contra a exatidão, ou pelo menos contra a aceitabilidade geral dessa teoria.

1) Nas enxertias compostas de garfos doentes, de *Sida rhombifolia*, e de cavalos sadios, de *Sida acuta*, poderiamos ainda entender que a avidez relativamente reduzida do cavalo, ao virus da "clorose infecciosa", não chegasse a retirar grandes quantidades do agente causador da doença, do estoque limitado do enxerto. No caso inverso, po-

rem, isto é, nos casos em que um cavalo doente e bem desenvolvido de *Sida rhombifolia* se acha ligado, por enxertia, a um minúsculo garfo de *Sida acuta*, é dificilmente compreensivel que a quantidade de virus afluido ao enxerto não chegue a produzir sintomas acentuados.

2) Também não acreditamos poder explicar, pela teoria de KLEBAHN, o carater atenuado dos sintomas manifestados em plantas de *Sida acuta carpinifolia* quando enxertadas com pés de *Abutilon striatum* DICKS var. *spurium* LYNCH. Nunca observamos, nesta última espécie, sintomas assás pronunciados, de modo que nos faltam elementos para atribuir à esta espécie uma elevada avidez para o virus da "clorose infecciosa". Ao contrário, em enxertos compostos de *Sida acuta carpinifolia* e de *Abutilon striatum spurium*, tanto o enxerto como o cavalo se caracterizam por sintomas extremamente brandos.

3) Finalmente, a admissão da existência de uma relação tão constante entre a quantidade do virus e a nitidez dos sintomas manifestados não estaria, tambem, de acordo com a teoria, hoje largamente difundida e aceita, da multiplicação autocatalítica dos virus. Se de acordo com esta teoria uma única partícula de virus tem a capacidade de transformar grande parte da proteina da planta infeccionada numa substância igual, na composição, a essa partícula de virus, não se pode admitir que a nitidez dos sintomas dependa, de maneira tão regular, da quantidade do virus originalmente introduzida na planta.

Para explicar, de fato, os diferentes gráos de intensidade na expressão dos sintomas em *Sida acuta carpinifolia*, devemos, ao meu ver, admitir que em enxertias homoplásticas desta espécie, a zona de enxertia é atravessada por substâncias que são retidas, na referida zona, em enxertias heteroplásticas.

A respeito da natureza dessas substâncias, podemos apenas fazer algumas conjecturas. Seria possivel, por exemplo, defender a hipótese de que o agente causador da "clorose infecciosa" de *Sida rhombifolia* consistisse de um só componente, caracterizado por partículas relativamente pequenas, ao passo que o virus causador da "clorose infecciosa" em *Sida acuta carpinifolia* e em *Abutilon striatum spurium* contivesse, alem desse, mais um componente, formado de partículas de maiores dimensões. Seguindo este pensamento, as partículas grandes deste segundo componente não poderiam, então, passar pela zona de ligação, em enxertias heteroplásticas.

Achariamos acertada esta suposição se as diferenças entre os 3 tipos de quadros sintomatológicos de *Sida acuta* fossem de carater qualitativo. Sendo, porem, as diferenças na manifestação dos sintomas,

de ordem puramente quantitativa, queremos antes admitir que o virus causador da "clorose infecciosa" em todas as espécies por nós estudadas, é simples e idêntico. Para explicar, porém, que esse virus a-pezarda sua composição não complexa, pode dar origem a diferentes gráos de expressão dos sintomas, poder-se-ia supôr, talvez, que o virus necessitaria da presença de uma outra substância, também composta de moléculas grandes, que agiria como "ativador", para desenvolver o máximo da sua eficiência. Este "ativador", presente em plantas naturalmente contaminadas, poderia passar, com facilidade, à zona de ligação das enxertias homoplásticas, mas com dificuldade em certas enxertias heteroplásticas. Essa dificuldade de passagem aumentaria, provavelmente, com a diminuição do gráo de parentesco entre enxerto e cavalo.

Outra possibilidade de explicação do fenômeno de gradação dos sintomas, que evitaria a necessidade de supôr a existência de ativadores do virus, consistiria em atribuir grande importancia para a provocação dos sintomas, às partículas "agregadas" do virus. Seria possivel, por exemplo, que as partículas simples do virus da "clorose infecciosa", só pudessem induzir sintomas de um carater muito brando em *Sida acuta carpinifolia*. Pelos sintomas mais graves seriam responsaveis as partículas "agregadas" do virus, de dimensões maiores e, justamente por causa disso, privadas da possibilidade de passar através da zona de enxertia, de componentes doentes de outras espécies ou até gêneros, de malváceas, para os componentes sadios de *Sida acuta carpinifolia*. Uma teoria semelhante foi aventada recentemente por A. A. BITANCOURT (trabalho ainda não publicado) para explicar, em experiências de transmissão por enxertia, o aparecimento de sintomas de dois tipos diferentes, na doença "psorosis" da laranjeira.

Com esta última interpretação terminamos estas considerações teóricas sobre o aparecimento, nos ensáios de transmissão da "clorose infecciosa" por enxertia, de 3 distintos gráos de intensidade da expressão dos sintomas em *Sida acuta carpinifolia*. Estas considerações visaram mais pôr em destaque a grande importância teórica do fenômeno, do que proporcionar, de fato, uma explicação perfeitamente satisfatória. Só observações em numero ainda muito mais abundante de enxertias, poderão tornar mais compreensivel a relação entre os agentes causadores da "clorose infecciosa" nas diferentes espécies e gêneros de malváceas. Nesse sentido, é nossa intenção continuar ainda os estudos e observações sobre a transmissão experimental da "clorose infecciosa" das malváceas.

STUDIES ABOUT THE EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF THE "INFECTIOUS CHLOROSIS" OF MALVACEAE

Abstract

1) *This paper is comprised of observations and experiments upon the experimental transmission of the "infectious chlorosis" of three species of Sida common in the State of São Paulo, viz Sida acuta* BURM. *carpinifolia* (L.) K. SCHUM., *Sida rhombifolia L. and Sida cordifolia L. and of two shrubs, cultivated in gardens for ornamental purposes, i. e. Abutilon striatum* DICKS *var. spurium* LYNCH *and Abutilon striatum* DICKS.

2) *We didn't succeed, by sap inoculation, in transmitting the virus of "infectious chlorosis" from diseased to healthy plants of Sida acuta carpinifolia and Sida rhombifolia.*

3) *Among the thousands of plants of Sida, grown in our experiments from seeds of diseased plants, we never observed any seedling exhibiting symptoms of the "infectious chlorosis". So we admit, that this disease in the genus Sida is not transmitted by seeds. It seems, that the same behaviour doesn't prove right for the genus Abutilon.*

4) *From the first group of graft experiments, performed between diseased and healthy components of Sida acuta carpinifolia, the results of which are listed in table 3, we can verify, that*

- *a) in graft unions the virus of "infectious chlorosis" passes easily from the diseased to the healthy component,*
- *b) that the conduction of virus in graft unions is carried out with higher speed in basipetal than in acropetal direction,*
- *c) that a graft union of only two days is sufficient to permit the passage of the virus from the diseased to the healthy component,*
- *d) that by submitting the virus-containing scion, before the execution of the graft, to high temperatures, the appearance of the symptoms in the stock may be delayed.*

5) *The second group of graft experiments consists of interspecific (= heteroplastic) grafts between the 3 species of Sida (See table 4 and 5). Healthy stocks of Sida rhombifolia caught the "infectious chlorosis" easily from diseased scions of Sida rhombifolia as well as of Sida acuta or Sida cordifolia. However stocks of Sida acuta displayed more serious symptoms of the "infectious chlorosis" after being infected from*

diseased scions of this species than if the virus was transmitted from scions of Sida rhombifolia. The same difference between the degrees of severity of symptoms was observed also in scions of Sida acuta, grafted respectively upon diseased stocks of the same species and of Sida rhombifolia (Plate 14, fig. G, and plate 15, figs. I-J).

6) *Finally, we made a group of intergeneric (heteroplastic) grafts between Sida and Abutilon (table 6). In some cases, the healthy component belonged to the genus Sida, in other cases to the genus Abutilon. We observed, that diseased scions of Abutilon spurium transmitted a virus able to produce normal symptoms of the disease in stocks of Sida rhombifolia, while only extremely weak symptoms of the same disease appeared under the same conditions, in stocks of Sida acuta carpinifolia (Plate 16, fig. L).*

7) *The reverse transmission of the virus of "infectious chlorosis" from diseased Sida to healthy Abutilon could be observed only in a few rare cases.*

8) *We concluded from the results of our experiments, that the infectious agents causing the disease in the different species of Malvaceae considered in this study are identical, but that this virus suffers in some cases weakening by passing through the zone of contact between stock and scion of heteroplastic graftings.*

9) *In the discussion, we attempt to explain the differences of the degree of symptom-expression in plants of Sida acuta infected from sources belonging to different species (Sida acuta, Sida rhombifolia, Abutilon spurium).*

The weaker forms of disease may be caused

a) by insufficient quantities of virus.

b) by the lack of a second virus component, necessary for the formation of a "virus-complex".

c) by the lack of an "activator"-substance.

d) by the lack of aggregated particles of the virus.

10) *In addition to setting forth in the discussion the pros and cons of these various theories, we still point out the susceptibility for reinfection with the virus of "infectious chlorosis" of those organs of diseased plants, which didn't display disease-symptoms, in consequence of the first infection.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Baur, E. (*) — 1904 — Zur Aetiologie der infektiösen Panaschierung. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 22:453-460.

2 — Baur, E. (*) — 1906 — Weitere Mitteilungen über die infektiöse Chlorose der Malvaceen und über einige analoge Erscheinungen bei Ligustrum und Laburnum. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 24:416-428.

3 — Baur, E. (*) — 1906 — Über die infektiöse Chlorose der Malvaceen. *Sitzungsber. d. preuss. Akad. d. Wissenschaften*, Berlin: 11-29.

4 — Cook, M. T. — 1931 — New virus diseases of plants in Porto Rico. *The Journ. of the Dept. of Agric. of Puerto Rico*, 15:193-195.

5 — Davis, E. F. — 1929 — Some chemical and physiological studies on the nature and transmission of "infectious chlorosis" in variegated plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 16:145-213.

6 — Hertzsch, W. (*) — 1927 — Beiträge zur infektiösen Chlorose. *Zsch. f. Bot.*, 20:65-80.

7 — Ikeno, S. — 1930 — Studien über einen eigentümlichen Fall der infektiösen Buntblättrigkeit bei Capsicum annuum. *Planta*, 11:359-367.

8 — Keur, J. Y. — 1933 — Seed transmission of the virus causing variegation of Abutilon. *Phytopathology*, 23:20.

9 — Keur, J. Y. — 1934 — Studies of the occurrence and transmission of virus diseases in the genus Abutilon. *Bull. Torrey Bot. Club*, 61: 53-76.

10 — Keur, J. Y. — 1934 — Partial recovery and immunity of virus-diseased-Abutilon. *Phytopathology*, 24:12.

11 — Klebahn, H. — 1932 — Fortsetzung der experimentellen Untersuchungen über Alloiophyllie und Viruskrankheiten. *Phytopath. Zschr.*, 4: 1-36.

12 — Klebahn, H. — 1936 — Versuche über das Wesen des Virus der Mosaikkrankheit des Tabaks und über einige andere Viruskrankheiten. *Phytopath. Zschr.*, 9: 357-370.

13 — Kunkel, L. O. — 1930 — Transmission of Sida mosaic by grafting. *Phytopathology*, 20:129.

14 — Lindemuth, H. (*) — 1907 — Studien über die sogenannte Panaschüre und über einige begleitende Erscheinungen. *Landwirtschaftliche Jahrbücher*, 36:807-861.

15 — Monteiro Filho, H. C. — 1936 — Monografia das Malvaceas brasileiras, Fasciculo I, O Gênero Sida, *Ministério da Agricultura, Secção de Publicidade*, Rio de Janeiro, 56 pp.

16 — Morren, E. (*) — 1869 — Contagion de la panachure, *Acad. Roy. Belg.*, Bull. II, 28:434-442.

17 — Paterson, D. D. — 1938 — Experimentación y Aplicación Estadística para el Agrónomo; traduccion del Ingeniero Agrónomo José Calzada B., *Ministério de Fomento*, Lima, Perú, 73 pp.

18 — Rona, P. — 1931 — Praktikum der physiologischen Chemie, I. Teil. Fermentmethoden 2. Auflage, Berlin, Julius Springer. 420 pp.

19 — Ross, A. Frank — 1941 — Purification and properties of alfalfa-mosaic-virus protein. *Phytopathology*, 31:394-410.

20 — Shifriss O., C. H. Myers, and Ch. Chupp — 1942 — Resistance to mosaic virus in the cucumber. *Phytopathology*, 32:773-784.

21 — Soriano, S. — 1934 — Notas sobre algunas enfermedades de los vegetales producidos por virus en la República Argentina. *Physis*, 11:87-90.

(*) Consultado por intermédio dos referatos de DAVIS e KLEBAHN.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 11

Fig. *A* — Enxertia das raizes entre uma planta sadia e outra doente de *Sida rhombifolia*. (Fot. 8/6/43. B. Mazza).

Fig. *B* — Dispositivo para maior facilidade da execução de enxertias em raizes. (Furo de dreno do fundo do vaso em posição lateral). (Fot. 8/6/43. B. Mazza).

Estampa 12

Fig. *C* — Sintomas da "clorose infecciosa" em folhas de *Sida cordifolia;* duas folhas doentes (à esquerda) em comparação com folha sadia. (Fot. 13/9/43. B. Mazza).

Fig. *D* — Dois diferentes gráos de severidade de sintomas da "clorose infecciosa" em folhas de *Sida acuta carpinifolia* (à esquerda) em comparação com folha sadia. (Fot. 8/7/42. B. Mazza).

Estampa 13

Fig. *E* — Vários gráos de severidade de sintomas da "clorose infecciosa" em 3 folhas de *Sida rhombifolia* (à direita) em comparação com uma folha sadia. (Fot. 8-7-42 e 13-9-43. B. Mazza).

Fig. *F* — Três folhas de *Abutilon striatum* var. *spurium* apresentando sintomas de "clorose infecciosa". (Fot. 17-6-42. B. Mazza).

Estampa 14

Fig. *G* — Ramos laterais de cavalos de *Sida acuta carpinifolia*, que tinham sido enxertados, 9 mêses antes, com garfos respectivamente de *Sida rhombifolia* (à esquerda) e de *Sida acuta carpinifolia* (à direita). E' patente a diferença da nitidez dos sintomas entre as folhas dos 2 ramos. (Fot. 13-9-43. B. Mazza).

Fig. *H* — Passagem da "clorose infecciosa", de um garfo doente para um cavalo originalmente sadio, de *Sida acuta carpinifolia*. Os sintomas nas folhas novas dos dois componentes são idênticos. (Fot. 16-7-42. B. Mazza).

Estampa 15

Fig. *I* — Passagem da "clorose infecciosa" de um garfo doente de *Sida rhombifolia* para um cavalo originalmente sadio, de *Sida acuta carpinifolia*. Os sintomas exibidos pelas folhas do cavalo são mais brandos do que os apresentados pelas folhas do enxerto. (Fot. 3-5-42. B. Mazza).

Fig. *J* — Passagem da "clorose infecciosa" de um cavalo doente de *Sida rhombifolia* para um garfo originalmente sadio de *Sida acuta carpinifolia;* os sintomas apresentados pelo enxerto são brandos. (Fot. 3-5-42. B. Mazza).

Estampa 16

Fig. *K* — Garfos de *Abutilon striatum* (à esquerda) e de *Abutilon striatum* var. *spurium* "sem sintomas" (à direita) enxertados sôbre cavalos doentes de *Abutilon striatum* var. *spurium*. A doença só passou para o garfo de *Abutilon striatum*, que apresenta sintomas da "clorose infecciosa" apenas numa folha. (Fot. 9-4-43. B. Mazza).

Fig. *L* — Ramos laterais de cavalos de *Sida acuta carpinifolia*, que tinham sido enxertados, 4 mêses antes, com garfos de *Sida acuta carpinifolia* (à direita) e de *Abutilon striatum spurium* (à esquerda). Nas folhas do cavalo desta última enxertia os sintomas quasi não são reconhecíveis. (Fot. 9-4-43. B. Mazza).

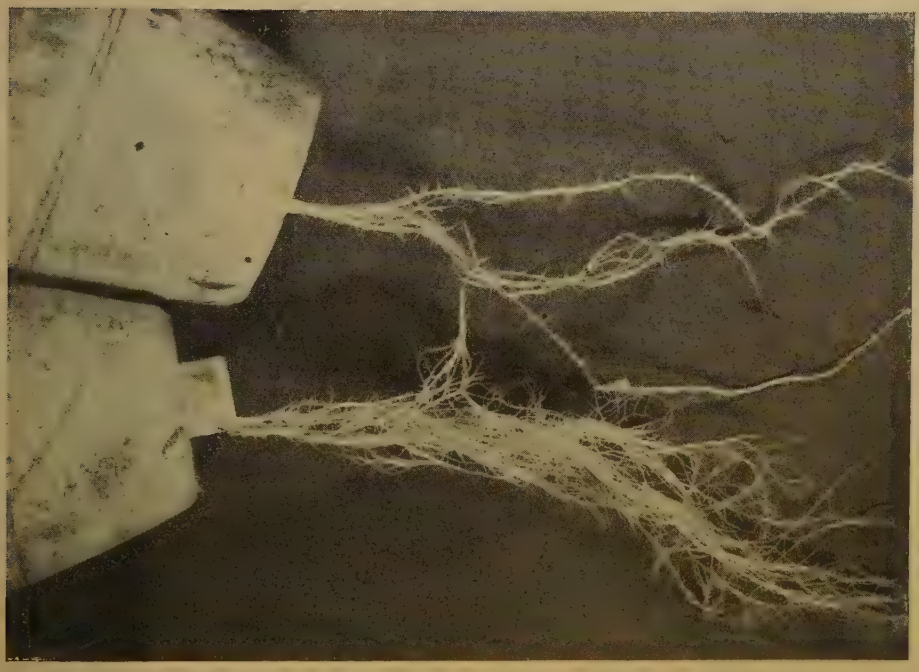
Estampa 17

Fig. *M* — Garfo de *Abutilon striatum spurium* "sem sintomas", enxertado em 2-4-43 sôbre *Sida rhombifolia* doente. Uma folha do enxerto apresenta uma mancha clorótica, sintoma característico da "clorose infecciosa". (Fot. 13-9-43. B. Mazza).

Fig. *N* — Ramos de *Waltheria americana*, apresentando sintomas de uma doença que lembram os causados pela "clorose infecciosa"; planta com infecção espontânea. (Fot. 16-2-43. B. Mazza).

———o———

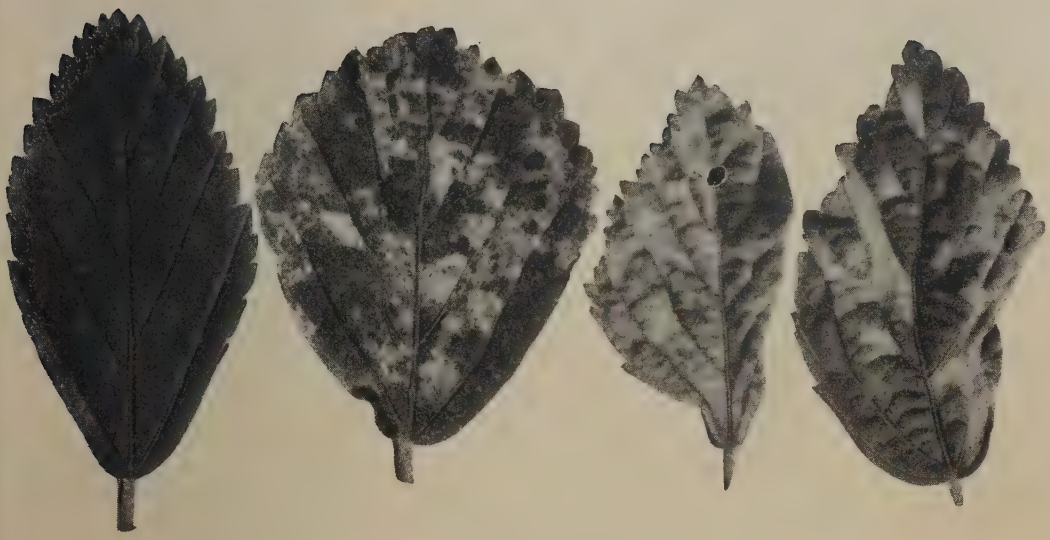
B



A

C

D



E

F

G

H

J

I

K

L

M

N

Vol. 14 — Art. 10 Dezembro de 1948

ESTUDOS SOBRE A ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DOS EQUIDEOS NO BRASIL

POR

V. Carneiro e R. Cunha

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMÁRIO

1 — INTRODUÇÃO:
O virus brasileiro isolado em São Paulo em 1937.
Caracterização clínica das epizootias americanas de encefalomielite no nosso meio. Diagnóstico clínico e diagnóstico de laboratório.

2 — CULTURA DO VIRUS EM EMBRIÃO DE PINTO:
Ensaios preliminares: DLM do virus para cobaia e camondongo. Passagens.
Preparo de vacinas formoladas.
Contrôle do valor antigenico.
Conservação e estabilidade.

3 — ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA:
Técnica de trabalho. Os virus de comparação. Ensaios preliminares: DLM das diversas amostras, preparo de vacinas, contrôle do valor antigenico.
Tipos de experiências realizadas.
Ensaios de imunidade cruzada com o tipo oeste: amostra argentina, amostra oeste.
Ensaios de imunidade cruzada com o virus venezuelano.
Relações imunologicas do virus brasileiro com o tipo leste.

4 — RESUMO E CONCLUSÕES.

Em 1937, em um primeiro trabalho sobre o assunto, eram relatados os estudos realisados em torno de um surto grave de encefalomielite infecciosa dos equideos, grassando em março do mesmo ano, no municipio de Tatuí, em São Paulo (7).

O carater infeccioso da doença, surgindo em fócos dispersos em varias direções e sob a forma de casos em serie, a especificidade para o cavalo em condições naturais, não sendo os bovinos atingidos, a presença de casos curados sem manifestações clinicas persistentes, a ocurrencia de casos curados com sequelas, a época do ano em que grassava, em pleno verão de calor intenso e de chuvas abundantes, o quadro clínico no seu conjunto, com febre, disturbios nervosos típicos, encefalite, ataxia locomotora, tonicidade muscular fortemente aumentada, — constituiram alguns dos numerosos fatores de caracterisação clínica da epizootia. Êles nos conduziram logo a enquadra-la no grupo das encefalites do cavalo e relaciona-las às encefalomielites do Continente, clareadas em sua etiologia desde 1931, pela demonstração inicial

de MEYER, HARING e HOWITT (22-23) e descritas de modo completo na literatura americana.

Do cerebro de um dos cavalos, da série de casos observados e autopsiados no fóco, depois de numerosas inoculações, na sua quasi totalidade negativas, realizadas na cobaia, no camondongo, no coelho, no pombo, no rato branco, no cavalo, — foi isolado na cobaia, com grande dificuldade, um virus filtravel em velas Berkefeld N e W, matando a cobaia em 5-6-8 dias nas primeiras inoculações, depois de um quadro típico de encefalite, precedido de febre, com apoio da cabeça contra a grade, sonolencia, tremores musculares generalizados, baba, paralisias, queda e morte.

O virus foi mantido no laboratório por passagens cerebrais em série na cobaia, realizadas mensalmente, ou de dois em dois meses. Era conservado em cerebro de cobaia em glicerina fosfatada de pH 7,2 a + 4° C. A amostra isolada em 1937 conta atualmente 77 passagens pela cobaia e o período de incubação da infecção experimental caiu regularmente, para 4-5 dias e mesmo para 3 dias em cobaias novas de 300 grs. Foi verificado regularmente patogenico para o camondongo, com o mesmo período de incubação da cobaia, menos regularmente para o pombo; no coelho resultados muito irregulares foram obtidos. A infecção experimental foi reproduzida no cavalo, por via cerebral e endovenosa, com incubação de 3-4 dias, febre, quadro clínico típico das encefalites, semeaduras estereis do cerebro e recuperação do virus do cerebro dos cavalos inoculados. Além disso, foi assinalada, nos casos de infecção natural e experimental, na cobaia, no cavalo, a presença do quadro histologico das encefalites infecciosas, com infiltração de celulas linfocitárias perivasculares, ausencia de corpúsculos de Negri ou de fócos de necrose, lesões estas que caracterisam outras encefalites, especificas ou não, passiveis talvez de uma confusão com a doença especial que se estudava.

Tratando-se da identificação inicial de um grupo de doenças cuja existência devia ser suspeitada no País, todos os aspectos clinicos, epidemiologicos e experimentais ao nosso alcance foram cercados no sentido de evitar confusões. E os dados numerosos reunidos, mostravam sempre que outras doenças, de carater clínico semelhante, deviam ser excluidas.

O diagnóstico clínico de encefalomielite infecciosa do cavalo se impunha por isso mesmo, desde o inicio. Era baseado em certo número de fatores que julgamos de importância essencial e que nos permitiam insistir, mais tarde, sobre a caracterização clínica das epizootias, de modo a permitir o seu reconhecimento no nosso meio (8). O

problema surgia cercado de certas dificuldades inexistentes nos Estados Unidos, onde a doença é muito mais frequente e bem conhecida dos veterinários, onde a epoca do ano em que aparecem os surtos dá uma indicação preciosa, as áreas flageladas são conhecidas, os serviços de pesquisas disseminados, as equipes de especialistas numerosas e onde a raiva epizootica das grandes especies não se verifica, indo a área dos morcegos hematofagos somente até o Mexico.

Têm por isso mesmo grande importancia no nosso meio êsses fatores de caracterização clínica das epizootias de encefalite especifica, permitindo num inquerito clínico e epidemiologico bem conduzido, quando realizado, afastar confusões e diagnósticos falsos que o laboratório com grandes esforços inuteis, não poderá confirmar. E a literatura já tem dois exemplos de confusões sobre os quais não é possivel insistir aqui. Mas convem assinalar que é possivel, não em casos isolados, mas em epizootias, caracterizar um fóco de encefalite específica, afastando outras doenças de quadro clínico semelhante, mas não identico.

A possibilidade de confusão com a raiva foi, *a priori*, independente de qualquer estudo de laboratório, logo afastada. A ausencia de antecedentes epidemiologicos para o lado de cão e dos morcegos hematofagos, a especificidade para o cavalo, sendo os bovinos em muito maior número no fóco, a presença de casos curados e de casos com sequelas, o quadro clínico no seu conjunto, ao lado dos dados acima rapidamente reunidos, indicavam, sem dúvida, uma encefalite especial. A pobreza dos resultados das inoculações iniciais e a dificuldade das primeiras passagens, a ausencia de corpúsculos de Negri, a inconstancia dos resultados no coelho, o quadro de sintomas no cavalo e na cobaia, com incubação curta, ausencia de agressividade, febre em curva difasica, — vinham confirmar o diagnóstico clínico. Não insistimos mais sobre o diagnóstico diferencial com a raiva porque a separação constituia problema elementar de rotina de clínica e de laboratório nas nossas condições de trabalho. Dezenas de materiais de raiva de bovinos, equinos e caninos passam, há vários anos, pelo nosso serviço no Instituto Biologico. Independentemente do diagnóstico clínico da epizootia, e na ausencia de dados epidemiologicos, o diagnóstico de raiva no laboratório é de extrema simplicidade, como se sabe. Apenas vale lembrar que em cerebro de cavalo ou de muar parece que com maior frequencia os corpúsculos de Negri não são às vezes encontrados, ou são mais raros, ou pouco caracteristicos. Mas as inoculações são bem sucedidas, o virus é facilmente isolavel, a cobaia tem sintomas especiais de excitação e agressividade e o cerebro dos animais inocula-

dos revela abundancia consideravel de corpúsculos nitidos, sem possibilidade de confusão.

Outras doenças do sistema nervoso central, de carater infeccioso ou toxico, foram consideradas, como o botulismo (15-23) e a intoxicação conhecida dos autores americanos sob o nome de "corn-stalk disease". Em ambas um inquerito inicial orienta. Além disso, o botulismo é afebril, de mucosas claras, tem quadro predominantemente paralítico e grave. Por outro lado a intoxicação tem evolução mais longa, curso em geral cronico e deixa lesões graves e intensas, como edema, hemorragias e zonas de necrose cerebral (37-38). Mas no nosso caso os cavalos não comiam milho e viviam soltos nas pastagens. Não cabe aqui alongarmo-nos mais sobre êsses aspectos clínicos da doença.

NOVOS ESTUDOS SÔBRE O VIRUS BRASILEIRO

DLM do virus para a cobaia e camondongo.
Cultura do virus em embrião de pinto.
Vacinas formoladas: DLM para cobaia e camondongo. Valor antigenico. Conservação e estabilidade.
Experiências de imunidade cruzada.

As dificuldades de se alcançarem condições de relativa segurança necessárias ao prosseguimento dêste genero de trabalhos, tratando-se de infecção grave, transmissivel com facilidade pelos mosquitos do genero *Aedes* e depois verificada na especie humana em surtos epidemicos, aliadas à ausencia de notificação de novos fócos que reclamassem trabalhos de laboratório para orientar medidas de proteção, como a produção de vacinas, — retardaram a continuação dos estudos sobre o assunto. Recentemente o problema pôde ser retomado e os resultados dêsses novos estudos devem ser agora relatados.

A questão essencial a investigar deveria ser, de inicio, a comparação da amostra de virus aqui isolada, do ponto de vista de imunidade cruzada, com os tipos de virus da literatura americana: o virus oeste, o leste e o venezuelano.

O primeiro foi descoberto em 1931, na California, por MEYER, HARING, e HOWITT (22-23) e é encontrado atualmente em 18 Estados americanos (25). O segundo surgiu em 1933 dos trabalhos de TEN BROECK e MERRIL (46) e de GILTNER e SHAHAN (11-12-13-42) por ocasião das epizootias graves da costa leste dos Estados Unidos. Os estudos seriados empreendidos depois, à medida que as epizootias surgiam, mostraram que a classificação em virus oeste e leste é esquematica, tendo sido transpostos os limites para área de ambos (25-28) e havendo já tres estados nos quais os dois tipos foram isolados. Final-

mente, o terceiro possuindo analogias imunologicas com o tipo leste, estudado por BECK e WYCKOFF (4), KUBES e RIOS (20), KUBES e DIAMANTE (19).

Ensaios preliminares eram necessários: determinação da DLM do virus em cerebro de cobaia, para cobaia e camondongo, por via cerebral; comportamento do virus por inoculação na membrana corioalantoide de embrião de pintos; titulagem do virus em embriões; preparo de vacinas formoladas; dosagem do seu valor antigenico em presença da mesma amostra em estudo; e passagens do virus pela corioalantoide de ovos embrionados. Era ainda necessário, como se verá, conhecer a DLM das amostras de virus usadas nos ensaios de imunidade cruzada, nas nossas condições de trabalho, preparar vacinas dessas diversas amostras e controlar o seu valor antigenico em face de cada uma das amostras.

*

* *

A descoberta da possibilidade de aplicação da técnica de cultura de virus em embrião de pinto aos virus americanos da encefalomielite do cavalo foi realizada, em 1935, por HIGBIE e HOWITT (16). Fixaram êsses autores o alto teor em virus nessas inoculações, as lesões observadas, o efeito letal sobre o embrião e outros detalhes técnicos. Por outro lado, aquisições anteriores de SHAHAN e GILTNER (41) de COX e OLITSKY (9) haviam demonstrado que o virus em cerebro de cavalo, de cobaia e de camondongo, inativado pelo formol, fornece um produto de valor antigenico apreciavel. Êstes dois últimos autores demonstraram ainda, de modo claro, que a proteção assegurada pela vacina formolada não corre por conta de frações de virus inativado e que a adição de virus ativo à vacina não melhora nem reforça o seu poder vacinante. Como consequencia, BEARD, FINKELSTEIN, SEALY e WYCKOFF (3) preparam uma vacina formolada obtida de cultura do virus em embrião de pinto, que fornece uma concentração de virus muito mais alta que cerebro de animais e um produto de valor antigenico muito mais solido.

O conjunto dêsses ensaios permitia, daí em diante, dispôr de uma excelente vacina contra as encefalomielites infecciosas do cavalo, garantindo uma proteção solida e duravel contra o virus inoculado por via cerebral, na cobaia, no camondongo e no cavalo. As vacinas dêste tipo entraram logo na rotina e tiveram sem dúvida, grande valor na profilaxia da doença. Sua superioridade sobre as vacinas de cerebro é realçada por EICHHORN e WYCKOFF (10) por LYON e WYCKOFF (21) e por todos os outros autores que delas se ocuparam. Algumas vaci-

nações humanas foram igualmente realizadas em pessoal de laboratório (2) e a fração vacinante, por meio de técnicas especiais, pôde ser parcialmente isolada das impurezas de emulsão formolada (45). A vacinação do cavalo se realisa em duas doses, de 10cc. cada uma, com uma semana de intervalo, por via subcutanea, ou em duas doses de 1cc., por via intradermica (34).

Em cultura de embrião de pinto o virus se encontra a uma concentração 1000-10000 ou mesmo 100000 vezes maior que em cerebro e um ovo fornece tanto virus quanto 500 cavalos (10). Do conjunto dêsses ensaios surgia cada vez mais nitida, a noção fundamental de que o valor antigenico das vacinas é aqui dependente do teor em virus no material original. O cerebro de camondongo fornece concentração em virus maior que o cerebro de cavalo, ou de cobaia (9) e o de pombo, ainda maior (14).

*
* *

O trabalho devia ser iniciado pela verificação do comportamento da amostra brasileira de virus por inoculação na membrana corioalantoide de embrião de pinto.

Foram usados ovos de galinha da raça Leghorn e posteriormente, algumas vezes, da raça Rhode Island. As inoculações eram feitas em embriões de 12-14 dias e mesmo de 10 dias (1) segundo a técnica de WOODRUFF e GOODPASTURE (47) de formação de uma câmara de ar artificial, com ligeiras variantes (5-6). As inoculações eram realizadas com 0,05 a 0,1cc de emulsões a 1p. 100 - 1p. 1000 - 1p. 10000, préviamente centrifugadas a baixa velocidade, 2500 r. m., durante 10m. Os ovos inoculados eram fechados por uma mistura de cêra e parafina e incubados a 37-38° C. pelo espaço de 22-24 até 30 horas. O controle do desenvolvimento do virus era assegurado pela formação de zonas de manchas escuras, zonas de opacidade, congestão dos vasos, diminuição dos movimentos do embrião e morte (16). Além disso, à abertura, zonas congestionadas e hemorragicas sobre o embrião, de aspecto cianotico. Mas o critério definitivo era, além disso, assegurado pela titulagem do virus em cobaias e camondongos por via cerebral, sendo os resultados, de um modo geral, paralelos nas duas espécies.

Os primeiros resultados foram os seguintes:

Uma série de 16 ovos, de 13 dias de incubadora, é inoculada com 0.1cc do sobrenadante de uma emulsão de 1p.100 do virus brasileiro de encefalomielite em cerebro de cobaia, de 54 passagens, conservado 19 dias em glicerina fosfatada na geladeira. Os ovos são abertos ao

cabo de 28 horas de estufa, depois de examinados no ovoscópio, quando se verifica que 14 embriões estão mortos e 2 ainda vivos. O material é triturado num agitador eletrico cêrca de 20-30 m. e uma emulsão a 20 % em água fisiologica, filtrada em gaze, é obtida. Cêrca de 10cc dessa emulsão são retirados para dosagem do virus em cobaias e camondongos, centrifugados a 2500 r. m. — 10 m. — e o sobrenadante utilizado para diluições sucessivas, que são inoculadas por via cerebral nas doses de 0,1 cc e 0,03 cc.

O restante da emulsão a 20% é formolado a 0,4% para obtenção da vacina.

Verifica-se então que enquanto o virus em cerebro de cobaia é infectante para a cobaia por via cerebral, nas diluições 10^{-3} — 10^{-4} e 10^{-5} mata uma cobaia de cada duas inoculadas, em cultura de embrião de pinto as diluições 10^{-6} — 10^{-7} são regularmente infectantes, com sintomas típicos e dentro de incubação normal. A diluição 10^{-8} ainda mata uma de duas cobaias inoculadas. Passagens de controle, de cerebro de cobaias infectadas, foram feitas em alguns casos julgados necessários, com resultados positivos. No camondongo novo, a emulsão de cerebro de cobaia triturado é infectante a 10^{-3} — 10^{-4} e o triturado de embriões a 10^{-6} — 10^{-7}. Outros testes, de varias partidas de vacina preparadas mais tarde, mostram que a 10^{-8} a emulsão de triturado de cultura de embriões é infectante para a cobaia, matando duas cobaias inoculadas por via cerebral com 0,1 cc.

Como veremos a seguir, as vacinas obtidas de material que fornece êsses títulos de virus têm no caso da amostra brasileira, um poder antigenico solido e duravel.

Um ensaio comparativo feito com uma amostra de virus argentino, que será referida mais adeante, mostra resultados mais ou menos similares, trabalhando-se nas mesmas condições. Em cerebro de cobaia o virus argentino mata a cobaia com sintomas típicos nas diluições a 1p. 100 e 1p. 1000. As diluições 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6} fornecem resultados negativos. Essas inoculações são feitas com material de cerebro glicerinado conservado 10 dias a + 4° C. Em cultura de embrião de pinto o virus é ativo a 10^{-7} para cobaia, e para camondongo, a 10^{-8}.

Passagens do virus brasileiro pela membrana corioalantoide de embrião de pinto foram mais tarde realizadas e o titulo do virus assim como o aparecimento das lesões e a morte do embrião, controlados regularmente. Algumas inoculações foram realizadas em camondongos com 0.03cc. em seguida à anestesia pelo eter e em cobaias com 0.1cc. Os resultados das inoculações em cobaias e camondongos estão reunidos na tabela n.° 1.

Seis passagens foram realizadas com emulsões a 1p. 100 - 1p. 1000 e 1p. 10000 e em ovos embrionados de 10-13 dias. Titulos infectantes mais altos devem ser obtidos com verificações precisas de detalhes técnicos, como sejam o momento de abertura dos ovos e diluições mais indicadas para inoculações. Mas êsses resultados nos parecem suficientemente demonstrativos e julgamos desnecessário prosseguir nas passagens em série.

TABELA 1

PASSAGENS DO VIRUS PELA CORIOALANTOIDE DE EMBRIÕES.
Titulagem do virus por inoculações em cobaias e camondongos.
Amostra brasileira.

Diluições	Passagens					
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª
10^{-3}	—	—	0/4	0/2	—	—
10^{-4}	4/4	0/2	0/4	2/2	1/2	0/2
10^{-5}	2/4	2/2	4/4	2/2	2/2	0/2
10^{-6}	4/4	2/2	4/4	2/2	2/2	2/2
10^{-7}	4/4	2/2	4/4	—	2/2	2/2
10^{-8}	—	2/2	4/4	—	—	—

N.º de animais mortos / N.º de inoculados.
1.ª e 3.ª passagens dosadas em 4 camondongos.
2.ª, 4.ª, 5.ª e 6.ª passagens dosadas em 2 cobaias.

A emulsão a 20 % acima referida, formolada a 0,4 % para preparo de vacina, é conservada à temperatura ambiente cêrca de 48 horas, sendo frequentemente agitada para inativação do virus. Testes de esterilidade em aerobiose e anaerobiose são realizados, assim como de inativação do virus por inoculação intracerebral, no camondongo novo, de uma diluição a 1p. 10 - 1p. 100 do sobrenadante da emulsão formolada, centrifugada a baixa velocidade. O material é em seguida conservado na geladeira durante dias para precipitação e o deposito removido por decantação, ou por centrifugação a baixa velocidade (27).

O controle do valor antigenico das vacinas é realizado por experiencias em cobaias, que são vacinadas com duas doses de 0,5cc. com uma semana de intervalo, em inoculações subcutaneas. A partir de 10-14 dias, a contar da segunda dose vacinante, as cobaias suportam 100-1000 - 10000 DLM cerebrais, contra morte dos controles.

Varias partidas de vacinas foram preparadas e os testes de DLM do virus e de valor protetor do produto obtido dão sempre resultados uniformes e seguros, como se verifica pela tabela 3, mostrando que a amostra de virus aquí isolada tem um alto poder antigenico nessas

condições. As cobaias suportam, quando vacinadas, emulsões de virus a 1p.100 e a 1p.10, isto é, cêrca de 1000 ou 10000 DLM por via cerebral, contra a morte dos controles, com sintomas típicos, em 4-5 dias. Os protocolos dos ensaios de imunidade cruzada que examinaremos mais longe, mostram a regularidade dêsses ensaios de proteção solida. Um exemplo típico, retirado de numerosos protocolos de experiências realisadas com a amostra aqui isolada, permitindo resultados uniformes, está esquematizado na tabela n.º 2.

TABELA 2

CONTROLE DO VALOR ANTIGENICO DAS VACINAS DE ENCEFALOMIELITE DO CAVALO — AMOSTRA BRASILEIRA

Vacina de embrião de pinto a 20% formolada a 0,4%
Título do virus em cobaia por via cerebral 10^{-8} — 0,1
Título do virus em camondongo por via cerebral 10^{-8} — 0,03

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Resultado
A	0,5 cc em duas doses, por via subcutânea, com uma semana de intervalo.	Realizada 10-14 dias depois da 2.ª dose de vacina com virus a 1p.100 - 1p. 10 = 1000 - 10000 DLM.	—
B			—
C			—
D			—
CONTROLES:			
E	NÃO VACINADAS	Virus a 1p.100	+
F		» » »	+
G		» » 1p.1000	+
H		» » »	+
I		» » 1p.10000	+
J		» » »	+
K		» » 1p.100000	+
L		» » »	—

Conservação do valor antigenico das vacinas. Os primeiros ensaios sobre tempo de conservação na geladeira, sem prejuizo do poder vacinante, feitos com vacinas formoladas de cerebro de camondongo, mostram estabilidade do produto até 63-65 dias (9) e em cerebro de cavalo até 7 meses (41). Com vacinas de embrião de pinto, SCHOENING (33) assinala valor protetor, por conservação na geladeira, até pelo menos 6 meses. Uma vacina com 9 meses de geladeira ainda era boa. Nossos ensaios foram um pouco mais longe, completando os dados acima referidos. Tivemos oportunidade de provar vacinas obtidas da amostra brasileira do virus, que com 10 meses de conservação na geladeira ainda protegiam cobaias contra cêrca de 1000 DLM cerebrais. Em outro ensaio, uma vacina

de virus venezuelano, com 22 meses de geladeira, ainda revelava poder protetor solido para a cobaia, sem perda apreciavel, em duas doses de 0,5 e 1cc respectivamente. Dêsses dados se podem tirar indicações para uso da clínica. À temperatura ambiente, SCHOENING verifica que ao cabo de um mês uma vacina ainda era boa, mas outra já havia perdido parte de seu poder antigenico. Em relação à duração da imu-

TABELA 3

PROVAS DE PROTEÇÃO DE VÁRIAS PARTIDAS DE VACINA DE ENCEFALOMIELITE DO CAVALO — AMOSTRA BRASILEIRA DE VIRUS

Partida	Título da vac.	Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Resultado
III	10^{-7}	736	0,5 cc — 1.ª dose 14-10-43	6-11-43 Virus brasileiro a 1p.10 — 0,1 cerebral.	—
		37	0,5 cc — 2.ª dose 22-10-43		—
		38			—
IV	10^{-7}	39	»	»	—
		40	»	»	—
		41	»	»	—
V	10^{-7}	42	»	»	—
		43	»	»	—
		44	»	»	—
VI	10^{-8}	45	»	»	—
		46	»	»	—
		47	»	»	—
VII	10^{-8}	48	»	»	—
		49	»	»	—
		50	»	»	—
VIII	10^{-7}	51	»	»	—
		52	»	»	—
		53	»	»	—
CONTROLES					
		838		6-11-43 Virus brasileiro 1p.10	+
		39		»	+

nidade, o mesmo autor assinala que ela persiste, embora com tendência para queda, até 9 meses depois da vacinação e que com o virus do tipo leste a imunidade já não é tão completa. Daí resultam indicações de revacinações anuais, ou de reforço de imunidade por uma nova dose anual.

ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA

Em três direções diversas, utilizando três técnicas de experiências, poderiam ser conduzidos êsses ensaios de relações imunologicas de tipos de virus das encefalites do cavalo:

1 — Em primeiro lugar, pelas experiências de neutralização *in vitro*, utilizando as diversas amostras de virus e soros de animais hiperimunizados.

2 — Em segundo lugar, pelos ensaios de proteção passiva cruzada, inoculando às espécies sensiveis, virus e soro das amostras conhecidas e da amostra em estudo.

3 — Em terceiro lugar, pelas experiências de imunidade ativa cruzada, imunizando cobaias com vacinas das diversas amostras conhecidas e da amostra em estudo, para prová-las em face dos diversos virus.

HOWITT (17) em 1935 realizava um estudo completo dos dois tipos norte-americanos, utilizando 13 amostras de virus e realizando as três técnicas acima enumeradas.

Iniciamos nossos estudos pelas experiências de imunidade ativa, isto é procurando verificar o comportamento da amostra brasileira de virus quando inoculada em cobaias protegidas contra os três tipos conhecidos e, por outro lado, a ação dos três tipos de virus em cobaias vacinadas com a amostra em estudo.

A orientação dos ensaios nesta direção era consequencia de duas razões. Em primeiro lugar, é esta a rotina de determinação de tipos de virus realizada nos laboratórios norte-americanos que recebem sempre novas amostras recentemente isoladas, no trabalho já avançado de levantar o mapa completo de distribuição dos tipos nos Estados Unidos e em outros países. Em segundo lugar, surgia a oportunidade de estudar simultaneamente a vacinação no laboratório, para atender a possíveis surtos epizooticos. E a necessidade da vacinação impõe a necessidade de conhecer o tipo de virus local para garantir a eficacia da intervenção.

Duas técnicas de experiências poderiam ser usadas no caso:

1 — proteger cobaias por meio das diversas vacinas formoladas, inoculadas por via subcutanea, e prová-las em face dos diversos virus, sendo a prova infectante realizada cêrca de duas semanas depois da vacinação.

2 — proteger cobaias por meio de vacinas, por via subcutanea e reforçar essa imunidade por meio de inoculação cerebral do mesmo virus usado na vacina. Essas cobaias são consideradas solidamente imunizadas e são então provadas em presença de outro virus.

Êste segundo tipo de ensaio é utilizado e recomendado pelos autores do Bureau de Industria Animal dos Estados Unidos (43-44).

Realizamos e descreveremos aquí essas duas técnicas e no seu conjunto os seus resultados nos parecem paralelos, com diferenças ligeiras. Principalmente no estudo comparado da nossa amostra com os tipos oeste e venezuelano, êsses dois generos de ensaios fornecem, em linhas gerais, os mesmos resultados e se completam.

Depois que foi alcançado um progresso consideravel na técnica de preparo das vacinas, como vimos, o primeiro genero de ensaios fornece por sí só, resultados muito nítidos, pois a vacinação subcutanea, em duas inoculações, confere uma imunidade solida de fato, que suporta 1000 - 10000 DLM por via cerebral, permitindo obter protocolos de experiencias claros e de resultados uniformes.

Acreditamos que há, assim, indicações que permitem pensar que, para o futuro, a técnica de determinação de tipos dos virus possa ser modificada e simplificada na sua sequencia, com economia de trabalho e tempo. O primeiro genero de ensaios, com efeito, pode ser concluido em um mês, protegendo cobaias por via subcutanea e provando-as em face dos virus, enquanto a imunização por meio de vacina por via subcutanea seguida de virus, por via cerebral, requer tres inoculações protetoras e o periodo de duração da experiencia completa se prolonga por cêrca de dois meses.

Os ensaios numerosos que se seguem, confirmando dados que a literatura registra numerosos, permitem verificar proteção solida das vacinas por via subcutanea contra inoculação cerebral a 1p. 10 e não se pode, supomos, pretender uma imunidade mais solida, porque não se pode ir mais longe no uso de doses altas na prova de infecção. OLITSKY e MORGAN (26) assinalam recentemente êsse fato da vacina por via subcutanea dar um grau de imunidade paralelo ao que resultará do virus vivo inoculado no cerebro. Em todo o caso, é possível que em casos especiais a experiência venha a provar a necessidade do segundo tipo de ensaios, como veremos. Mas os dois tipos foram aquí realizados.

TÉCNICA DO TRABALHO

Amostras de virus usadas. —As experiências aqui descritas foram realizadas com a amostra brasileira isolada em São Paulo, com uma amostra oeste, uma argentina, que imunologicamente pertence ao tipo oeste, uma do tipo leste e uma do tipo venezuelano.

Era necessário realizar alguns ensaios preliminares de modo a dispor de dados para a rotina dos ensaios de imunidade cruzada. Êsses ensaios preliminares seriam:

1 — DLM das diversas amostras em cerebro de cobaia, em glicerina fosfatada na geladeira, material utilizado nas provas de infecção.

2 — DLM das mesmas amostras em cultura de embrião de pinto.

3 — Preparo de vacinas formoladas das diversas amostras.

4 — Determinação do valor antigênico dessas vacinas em cobaias inoculadas por via cerebral.

A amostra brasileira em estudo conta atualmente cêrca de 80 passagens pelo cerebro de cobaia. Os dados essenciais sôbre DLM de cerebro de cobaia e de cultura em embrião de pinto estão já referidos em páginas anteriores. Convém assinalar que todos os nossos ensaios foram feitos com emulsões diluidas em água fisiológica de pH 7, 2 e que com o uso de soluções especiais, como o caldo hormonio, títulos infectantes mais altos são alcançados.

O critério de infecção positiva nas inoculações das provas de infecção é baseado em certo número de dados: período de incubação, sintomas iniciais, sintomas típicos, paralisias, quéda e morte. Raramente houve necessidade de passagens para controle da causa específica da morte. O tempo de observação dos animais inoculados era pelo menos de 10 dias.

A amostra de virus argentino, de ROSENBUSCH (31), nos foi cedido em Outubro de 1937, por gentileza de J. TRAVASSOS, do Instituto Butantan. O cerebro de cobaia que recebemos tinha 5 meses de conservação a — 15° C. Esta amostra tem uma incubação habitual, em cobaias de 400-500 grs., de 3-4 dias, ao passo que a amostra brasileira nas mesmas condições, dava uma incubação de 4-5 dias. Em cobaias novas, de 300 grs., a incubação para ambas as amostras, é mais curta e no curso de numerosas passagens houve uma diminuição de período de incubação. No curso de numerosas passagens, feitas simultaneamente, com ambas as amostras, o sacrifício das cobaias inoculadas com virus argentino era quasi sempre realizado no 3.° - 4.° dia e com a amostra brasileira no 4.° ou 5.°.

A DLM da amostra argentina em cerebro de cobaia era 10^{-3} ou às vezes 10^{-4} para a cobaia. Nos camondongos os resultados são mais ou menos idênticos.

Em cultura de embrião de pinto, a DLM para a cobaia alcança 10^{-7} e para camondongo 10^{-8}. A diluição 10^{-9} ainda mata um camondongo em 4 inoculados. As vacinas obtidas protegiam cobaias regularmente contra virus a 1p.100 e 1p.10, isto é, contra cêrca de 100-1000 DLM.

A amostra oeste nos foi cedida por gentileza de S. TORRES, que a recebeu de ROSENBUSCH. Deve ser pois, uma amostra oeste, da California, enviada por K. F. MEYER. Sofreu nas nossas mãos cerca de 25 passagens. Mata a cobaia regularmente até 1p.10000 e a 1p.100000 mata uma cobaia em duas inoculadas. Tem incubação de 3 dias e em cobaias menores, de 2 dias e meio. O título do virus em cultura de embrião era 10^{-7} e a vacina obtida protegia cobaias contra virus a 1p.100 e 1p.10 em inoculações cerebrais de 0,1 cc. EICHHORN e WYCKOFF (10) assinalam que o virus oeste tem um limite infectante, em embrião, de 10^{-8} e em circunstâncias favoraveis alcança 10^{-9} e que em nenhuma vacina de uso comercial, o teor em virus é inferior a 10^{-7}. A vacina obtida protegia de fato as cobaias contra o máximo, praticamente, de doses infectantes ingetaveis.

O virus da Venezuela, enviado por gentileza de WYCKOFF, sofreu nas nossas mãos, 13 passagens. Em cobaias de 300 grs. a incubação habitual é de cêrca de 70 hs. e a duração de 4-5, até 12 horas. A temperatura normal dessas cobaias parece muito variavel, entre 38°,4 - 39°3. As inoculadas, ao cabo de 6 horas já apresentam, às vezes, elevação térmica de 39°,8 - 39°,9, sendo normal em

outras, a temperatura. Em 22 horas todas as quatro inoculadas têm mais de 40°C: 40°,2 - 40°,4 — 41°,0 e 41°,1. Em 29 horas ainda há febre: 40°,5 — 40°,4 — 40°,8 — 40°,4 e em 47 horas: 40°,5 — 39°,5 — 41°,3 — 38°,3. A fase final da doença, ordinariamente revela queda abaixo do normal: 37°,8 — 37°,5 — 36°. No camondongo os primeiros sintomas são verificados ao cabo de 92-96 horas e a evolução se processa em 8-20 horas. Em cobaias maiores, 400-500 grs., em outras séries de ensaios, depois de passagens, a diluição 10^{-5} ainda é infectante para cobaia, e a 10^{-6} não o é mais. A incubação mais curta era de 64 horas e a duração de 24-36 horas.

BECK e WYCKOFF (4) assinalam os primeiros sinais de paralisia em 48 horas e morte das cobaias em 3-5 dias. A infecção é realizavel por via subcutânea. Em cultura de embrião os mesmos autores assinalam que a DLM alcança 10^{-8}.

A vacina do embrião de pinto, nos nossos ensaios, protege contra inoculações de virus a 1p.100; não usamos diluições mais fortes, como se verifica nas tabelas de imunidade cruzada.

A amostra leste, recebida por gentileza do prof. ROSENBUSCH, sofreu nas nossas mãos cêrca de 30 passagens pela cobaia. Desde as primeiras inoculações verifica-se a maior agressividade dêste tipo de virus, que se aproxima do venezuelano, com incubação muito curta e evolução rápida. Os sintomas iniciais podem ser observados em 40-45 horas, às vezes em 36 horas e a duração é de 4-6 horas, em média. Dá um quadro aparentemente mais grave, aproximado de que se vê no virus da Venezuela: contraturas generalizadas e violentas, agitando todo o corpo, tonicidade muscular fortemente aumentada, aceleração respiratória, apoio da cabeça contra a grade, opistotono, queda rápida em decubio lateral, tremores, movimentos de pedalagem. A temperatura alcança 40° - 40°,5 em 16 horas. O título do virus em embrião, nos nossos ensaios, era 10^{-8}.

Nas vacinações com vacinas do tipo leste encontramos as primeiras dificuldades sérias em proteger cobaias por meio de duas doses vacinantes, contra a infecção cerebral, sem encontrarmos causa exata para explicá-las. Algumas vezes, em ensaios preliminares, com duas doses de 0,5 cc. de vacina, as cobaias infectadas com virus a 1p.1000 se mostravam protegidas, mas êsses resultados, em seguida, estavam longe de ser uniformes. Quando as experiências eram prosseguidas os resultados eram já discordantes e várias cobaias do lote vacinado vinham a morrer no momento da prova de infecção. Para assegurar proteção solida e regular contra a infecção cerebral foi necessário realizar várias doses de vacina, 3-4 inoculações de 0,5 - 1-2 cc de vacina. Com duas partidas de vacina o mesmo resultado se repete. Não vimos referências precisas na literatura, para explicar o fato. GILTNER e SHAHAN usaram o virus leste por via menos severa que a cerebral, mas em ensaios realizados quando ainda não se usavam vacinas de embrião.

Um estudo comparativo das diferenças entre os dois tipos americanos, de sintomas, curva térmica, doses mínimas infectantes, é feito por HOWITT (18).

ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA COM VIRUS DO TIPO OESTE

Como se verá, uma primeira série de ensaios foi realizada com a amostra de virus argentino e outra com uma amostra oeste americana da California. A amostra argentina, pelos trabalhos de ROSENBUSCH (32) confirmados por MEYER, WOOD, HARING e HOWITT (24) e por HOWITT (17), imunologicamente é identica ao tipo oeste.

Do ponto de vista dos sintomas na cobaia, do periodo de incubação, do carater de virulencia, assim como dos dados diversos da epizootia, pareceu-nos, desde o inicio, que o virus aquí isolado se aproximava nitidamente do tipo oeste (7). Quando recebemos a amostra argentina e as primeiras inoculações foram realizadas com essa amostra, a suposição inicial parecia ainda mais procedente: o quadro geral da infecção experimental era, em linhas gerais, identico; apenas a amostra argentina matava cobaias em 3-4 dias e a nossa em 4-5 dias (8). Os sintomas iniciais de sonolencia, ataxia locomotora, paralisias flacidas, dando um andar torcido típico, o periodo de incubação, a agressividade inicial irregular, nas primeiras passagens, pareciam indicações do tipo oeste. O tipo leste, como vimos, dá incubação mais curta, evolução mais rápida, sintomas mais graves, paralisias por contraturas, instalando-se nítidas e rápidamente desde o inicio, e deixa logo a impressão de um virus de poder infectante pronto e elevado. No curso de centenas de inoculações, o quadro de sintomas podia ser com frequencia observado, nas suas fases mais variadas, e essas diferenças pareciam, no conjunto, indicar separações nítidas.

Como se verá, do ponto de vista de imunidade cruzada, essas indicações não são confirmadas.

Os primeiros ensaios, realizados com a amostra argentina de ROSENBUSCH, foram os seguintes:

Experiencia n.º 1 — A sequencia dêsses ensaios, repetida depois em linhas gerais, com os outros tipos, foi conduzida do seguinte modo:

1 — 12 cobaias recebem uma primeira dose de 0,5cc de vacina brasileira. A vacina usada tinha a DLM em embrião préviamente fixada igual a 10^{-8} para cobaia e camondongo por via cerebral. Uma semana mais tarde o lote de cobaias recebe a segunda dose de 0,5cc de vacina.

2 — 20 dias depois da segunda dose de vacina o lote de 12 cobaias é dividido em dois para a prova de infecção: seis recebem 0,1cc de virus a 1p.100, da amostra brasileira e seis recebem o virus argentino a 1p.100.

3 — Controles, de cobaias normais, são acrescentados aos lotes, como se verifica pela tabela 4, onde a amostra brasileira é ativa para cobaias a 1p.1000 e a 1p.10000 mata uma cobaia em duas inoculadas. Os controles do virus argentino mostram que o titulo infectante vai a 1p.1000, falhando as inoculações com diluições mais altas.

Verifica-se de modo nítido, na mesma tabela, que as cobaias que recebem o virus brasileiro resistem à prova de infecção de 100 —

TABELA 4

EXPERIÊNCIAS DE IMUNIDADE CRUZADA: AMOSTRA BRASILEIRA — VIRUS ARGENTINO

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
1432	5-5-42 — 1.ª dose vac. bras. 0,5 cc — 12-5-42 2.ª dose, 0, 5 cc	1-6-42 Infec. v. bras. 1p.100	—
33	» »	»	—
34	» »	»	—
35	» »	»	—
36	» »	»	—
37	» »	»	—
38	» »	2-6-42 Infec. v. arg. 1p.100	+
39	» »		
40	» »	»	+
41	» »	»	+
42	» »	»	+
43	» »	»	+
		morte acidental	
CONTROLES			
1444		1-6-42 v. bras. 1p.100	+
45		» »	+
46		» 1p.1000	+
47		» »	+
48		» 1p.10000	+
49		» »	—
1464		2-6-42 v. arg. 1p.100	+
65		» »	+
66		» 1p.1000	+
67		» »	+
68		» 1p.10000	—
69		» »	—
70		» 1p.100000	—
71		» »	—

Os ensaios a que se refere esta tabela foram repetidos em outras séries de cobaias com resultados idênticos.

1000 DLM. As inoculadas com virus argentino morrem todas dentro do mesmo periodo dos controles, embora recebendo uma dose infectante menor, isto é, cêrca de 10 - 100 DLM.

Estas experiencias foram repetidas em outro lote, com resultados, de um modo geral, identicos.

Experiencia n.º 2 — Vacinação com vacina argentina: prova de infecção com virus argentino e brasileiro.

Do mesmo modo que na experiencia anterior, como se vê na tabela 5, um lote de 12 cobaias é imunizado por duas doses de 0,5cc de vacina argentina, com uma semana de intervalo. 20 dias depois da segunda dose vacinante a prova de infecção é realizada: 6 cobaias re-

TABELA 5

EXPERIENCIAS DE IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS ARGENTINO — AMOSTRA BRASILEIRA

Cobaias imunizadas com vacina de virus argentino

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
1452	5-5-42 - 1.ª dose 0,5 cc vac. arg.	12-5-42 - 2.ª dose 0,5 cc subc.	2-6-42 Infec. v. arg. 1p.100	—
53	»	»	»	—
54	»	»	»	?
55	»	»	»	+
56	»	»	»	—
57	»	»	»	—
58	»	»	1-6-42 Infec. v. bras. 1p.100	+
59	»	»	»	+
60	»	»	»	+
61	»	»	»	+
62	»	»	»	+
63	»	»	»	+

CONTROLES

1464	2-6-42 v. arg. 1p.100		+
65	»	»	+
66	»	1p.1000	+
67	»	»	+
68	»	1p.10000	—
69	»	»	—
1444	1-6-42 v. bras. 1p.100		+
45	»	»	+
46	»	1p.1000	+
47	»	»	+
48	»	1p.10000	+
49	»	»	—

cebem virus argentino a 1p.100 e mostram solida imunidade: 6 recebem virus brasileiro a 1p.100 e morrem todas como os controles. Os controles são aqui, para virus argentino e brasileiro, os mesmos da tabela 4.

Experiencias n.º 3 e 4 — Ensaios de imunização por meio de vacina por via subcutanea seguida de inoculação de virus por

TABELA 6

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS ARGENTINO — VIRUS BRASILEIRO

Cobaias solidamente imunizadas

Cobaias	Imunização					Prova de infecção		Result.
	Vacina	Vacina	Virus					
1821	9-10-42 vac, arg. 1.ª dose 0,5 cc	16-10-42 2.ª dose	31-10-42	v. arg. 1p.10	—	20-11-42	v. bras. 10^{-2}	+
22	»	»	»	»	—	»	»	+
23	»	»	»	1p.100	—	»	»	++
24	»	»	»	»	—	»	»	++
25	»	»	»	1p.10	—	»	10^{-3}	++
26	»	»	»	»	—	»	»	++
27	»	»	»	1p.100	—	»	»	++
28	»	»	»	»	—	»	»	++
1851	1.ª dose 0,5 cc 21-10-42 vac. bras.	27-10-42 2.ª dose	20-11-42	v. bras. 1p.10	—	10-12-412	v. arg 10^{-3}	+
52	»	»	»	»	—	»	»	+
53	»	»	»	»	—	»	10^{-2}	++
54	»	»	»	»	—	»	»	++
CONTROLES								
1866			31-10-42	v. arg. 10^{-2}	+			
67			»	»	+			
1959			20-11-42	v. bras. 10^{-4}	+			
60			»	»	+			
61			»	10^{-3}	+			
62			»	»	+			
63			»	10^{-2}	+			
64			»	»	+			
2023						10-12-412	v. arg 10^{-3}	+
24						»	»	++
25						»	10^{-2}	++
26						»	»	++

Cobaias vacinadas com duas doses de 0,5 cc por via subcutânea, com uma semana de intervalo e que receberam virus vivos por via cerebral, isto é, consideradas solidamente imunizadas.

Cêrca de 20 a 30 dias mais tarde sofrem a prova de infecção realisada com outro virus.

Aqui se confirma a ausência de relação imunológica da amostra brasileira com o virus argentino.

via cerebral. As duas séries de ensaios dêste tipo, do virus argentino com amostra brasileira, estão reunidas na tabela 6:

a — 8 cobaias são vacinadas por via subcutanea, em duas doses, com vacina de virus argentino.

15 dias mais tarde, recebem por via cerebral o mesmo virus a 1p.100 e 1p.10 e resistem todas. São assim consideradas solidamente imunizadas, de acôrdo com a técnica de determinação de tipos dos autores norte-americanos.

20 dias mais tarde, sofrem a prova de infecção com a amostra brasileira a 1p.1000 e a 1p.100. Todas têm sintomas típicos e morrem de encefalite dentro do periodo habitual. Apenas uma tem sintomas típicos, mas de evolução lenta, permanecendo doente, durante varios dias. Casos identicos, de imunidade de grupo, são registrados nos ensaios dos autores que trabalharam com virus oeste, leste e venezuelano.

b — Do mesmo modo, a vacinação brasileira pela mesma técnica fornece resultados similares:

4 cobaias são vacinadas por via subcutanea com vacina brasileira.

Suportam, 24 dias depois, o mesmo virus a 1p.100 e a 1p.10 e são consideradas solidamente imunizadas contra a amostra brasileira.

Vinte dias depois, sofrem a prova de infecção com virus argentino a 1p.100-1p.1000, isto é, com doses infectantes inferiores. Nenhuma proteção revelam, como se vê na tabela 6.

Em face dessas séries de ensaios, as primeiras protegendo cobaias por via subcutanea e as segundas protegendo com vacinas e reforçando a imunidade por meio de inoculação de virus, por via cerebral, verifica-se que não há relação imunologica de amostra brasileira com o virus argentino, isto é, a amostra brasileira aquí isolada não pertence ao tipo oeste.

Êsses resultados eram surpreendentes em vista dos dados de analogias a que atrás nos referimos e vinham reclamar outras séries de experiencias utilizando os outros tipos de virus conhecidos.

Alguns ensaio foram porém realizados com outra amostra oeste, uma amostra norte-americana de K. F. Meyer.

Experiencia n.º 5 — 12 cobaias são vacinadas com vacina da amostra oeste, como se vê pela tabela 7. A prova de infecção é realizada em seguida, dividindo o lote vacinado em dois: seis cobaias recebem o virus oeste a 1p.100 e a 1p.10 e resistem todas; as outras seis recebem o virus brasileiro a 1p.100 — 1p.10 e morrem todas, do mesmo modo que os controles.

Os controles da prova de infecção, incluidos na tabela 7, mostram que o virus oeste a 1p.1000 — 1p.10000 mata as cobaias inoculadas regularmente. O virus a 1p.100000 mata uma cobaia em duas inoculadas. A vacina oeste assegura pois uma proteção solida contra o proprio virus oeste, mas não protege contra a nossa amostra. Os dados reunidos na tabela permitem verificar resultados muito regulares.

TABELA 7

ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS OESTE — VIRUS BRASILEIRO

Vacinação com vacina oeste.

Prova de infecção: virus oeste
virus brasileiro

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
2036	17-12-42 - 1.ª dose 24-12 - 2.ª dose vac. oeste 0,5 cc 0,5 cc	15-1-43 v. oeste 1p.100	—
2037	» »	» »	—
38	» »	» »	—
39	» »	» »	—
40	» »	» 1p.10	—
41	» »	» »	—
42	» »	23-1-43 v. bras. 1p.100	+
43	» »	» »	+
44	» »	» »	+
45	» »	» »	+
46	» »	» 1p.10	+
47	» »	» »	+
CONTROLES			
2060		15-1-43 v. oeste 1p.1000	+
61		» »	+
62		» 1p.10000	+
63		» »	+
64		» 1p.100000	+
65		» »	—
2066		23-1-43 v. bras. 1p.100	+
67		» »	+
68		» 1p.1000	+
69		» »	+

Experiência n.º 6 — Do mesmo modo, tabela 8, as cobaias vacinadas com vacinas da amostra brasileira suportam o mesmo virus a 1p.100 — 1p.10 regularmente. O lote infectado com o virus oeste a 1p.1000 — 1p.100 nenhuma proteção oferece.

TABELA 8

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS BRASILEIRO — VIRUS OESTE

Vacinação com vacina brasileira
Prova de infecção: Virus brasileiro
Virus Oeste

Cobaias	Vacinação		Prova de infecção		Result.
2048	17-12-42 - 1.ª dose vac. bras. 0,5 cc	24-12 - 2.ª dose 0,5 cc	23-1-43 v. bras.	1p.100	—
49	»	»	»	»	—
50	»	»	»	»	—
51	»	»	»	»	+
52	»	»	»	»	—
53	»	»	»	»	—
54	»	»	15-1-43 v. oeste	1p.100	+
55	»	»	»	»	+
56	»	»	»	»	+
57	»	»	»	»	+
58	»	»	»	1p.1000	+
59	»	»	»	»	+
CONTROLES					
	Os mesmos da tabela anterior				

Como se sabe, do ponto de vista de imunidade cruzada, o virus oeste e o argentino são idênticos. ROSENBUSCH assinala porém que a amostra argentina tem virulência menor que a californiana. O presente ensaio visava verificar si a amostra mais virulenta vacinava contra a brasileira.

ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA COM O VIRUS DA VENEZUELA

Experiência n.º 7 — Como nos ensaios anteriores, 12 cobaias são vacinadas com vacina da amostra brasileira, em duas doses por via subcutanea. Considerando que a DLM das duas amostras usadas na prova de infecção é mais ou menos identica como se vê pelos controles, esta prova foi realizada, nos dois casos, com virus a 1p.100 e é praticada 14 e 19 dias depois da segunda dose vacinante. Como se verifica na tabela 9, as cobaias que recebem o virus brasileiro resistem, enquanto as que recebem o virus venezuelano morrem com sintomas típicos dentro dos periodos normais. Controles das inoculações de virus são incorporados à tabela 9 onde se vê um ensaio de DLM do virus venezuelano.

Experiencia n.º 8 — Do mesmo modo, tabela 10, 12 cobaias são vacinadas com vacina de virus da Venezuela. 6, recebendo o mesmo virus, mostram solida imunidade contra cêrca de 1000 DLM cerebrais. 6 outras do mesmo lote, recebendo o virus brasileiro, mor-

rem com sintomas típicos, do mesmo modo que os controles que são os mesmos da tabela 9.

Experiencia n.º 9 — Cobaias solidamente imunizadas contra o virus venezuelano: duas doses de vacina + virus. Prova de infecção pelo virus brasileiro.

4 cobaias recebem duas doses de vacina, conforme se vê na tabela 11. 24 dias depois da segunda dose de vacina suportam o mesmo virus venezuelano a 1p. 100, correspondendo a cêrca de 100-1.000 DLM, tabela 11.

TABELA 9

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS BRASILEIRO — VIRUS VENEZUELANO

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
1621	9-7-42 vac. bras. 1.ª dose 0,5 cc — 17-7 — 2.ª dose 0,5 cc	31-7-42 v. bras. 1p.100	—
22	» »	»	—
23	» »	»	—
24	» »	»	—
25	» »	»	—
26	» »	»	—
27	» »	5-8-42 v. ven. 1p.100	+
28	» »	»	+
29	» »	»	+
30	» »	»	+
31	» »	»	+
32	» »	»	+
CONTROLES			
1633		31-7-42 v. bras. 1p.100	+
34		»	+
1651		5-8-42 v. ven. 1p.100	+
52		» »	+
53		» 1p.1000	+
54		» »	+
55		» 1p.10000	+
56		» »	+
57		» 1p.100000	—
58		» »	+

Cêrca de um mês depois são infectadas com a amostra brasileira a 1p.100 e o resultado é o seguinte: duas morrem com sintomas típicos, uma terceira tem sintomas iniciais e melhora, com restabelecimento completo, e a quarta nada apresenta.

Aquí se vê uma relação imunologica, que não parece surpreendente si considerarmos que o virus venezuelano, segundo BECK e WYCKOFF, tem relações mais aproximadas com o virus leste. As relações da nossa amostra com este últimos serão examinadas mais adiante.

TABELA 10

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS VENEZUELANO — VIRUS BRASILEIRO

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
1639	9-7-42 vac. ven. 1.ª dose 0,5 cc — 17-7 - 2.ª dose 0,5 cc	5-8-42 v. ven. 1p.100	—
40	» — »	»	—
41	» — »	»	?
42	» — »	»	—
43	» — »	»	—
44	» — »	»	—
		31-7-42 infec. v. bras.	
45	» — »	1p.100	+
46	» — »	»	+
47	» — »	»	+
48	» — »	»	+
49	» — »	»	+
50	» — »	»	+
CONTROLES			
	Os mesmos da tabela anterior		

Experiencia n.º 10 — Cobaias solidamente imunizadas: vacina + virus brasileiro e prova de infecção com virus venezuelano. 6 cobaias são vacinadas com vacina brasileira, tabela 11, e resistem ao mesmo virus a 1p.10 por via cerebral. A prova de infecção realizada com virus venezuelano a 1p.100, mata todas as cobaias, do mesmo modo que os controles.

Nenhuma proteção cruzada completa se verifica pois, nestas séries de experiencias com o virus venezuelano.

ENSAIOS DE IMUNIDADE CRUZADA COM O VIRUS LESTE

Experiencia n.º 11 — Em uma primeira série, 12 cobaias são vacinadas com vacina brasileira, em duas doses, com uma semana de intervalo. Considerando a virulencia mais acentuada do virus leste, as provas de infecção foram feitas quasi sempre com dilui-

ções a 1p.1000, raramente a 1p.10000. Uma das tabelas adiante incluida, mostra que o virus leste mata cobaias por via cerebral a 1p. 10000, e a 1p.1000000 pode ainda matar uma de cada duas cobaias inoculadas, embora êsses resultados não sejam sempre regulares. Mas a 1p.1000 o virus é regularmente infectante para cobaias normais.

Nêste primeiro ensaio de vacinação com vacina brasileira, tabela 12, as cobaias infectadas com o virus brasileiro a 1p.100 e a 1p.10, correspondendo a 1000 e a 10000 DLM, resistem, enquanto das seis que recebem o virus leste a 1p.1000 e a 1p.10000, morrem cinco.

TABELA 11

IMUNIDADE CRUZADA — VIRUS VENEZUELANO — VIRUS BRASILEIRO

Imunização com vacina e virus

Cobaias	Imunização			Prova de infecção	Result.
	Vacina	Vacina	Virus		
566	5-8-43 vac. ven. 1.ª dose 0,5 cc	13-8-43 2.ª dose	6-9-43 v. ven. 1p.100 —	2-10-43 v. bras. 1p.100	+
68	»	»	» —	»	+
69	»	»	» —	»	+
71	»	»	» —	»	—
CONTROLES					
572			6-9-43 v. ven. 1p.100 +		
73			» +		
574				2-10-43 v. bras. 1p.100	+
75				»	+
576	5-8-43 vac. bras. 1.ª dose 0,5 cc	13-8-43 2.ª dose	2-9-43 v. bras. 1p.10 —	2-10-43 v. ven. 1p.100	+
77	»	»	» —	»	+
78	»	»	» —	»	+
79	»	»	» —	»	+
80	»	»	» —	»	+
81	»	»	» —	»	+
CONTROLES					
582			2-9-43 v. bras. 1p.10 +		
83			» +		
584				2-10-43 v. ven. 1p.100	+
85				»	+

Experiencia n.º 12 — Os ensaios de vacinação com vacina brasileira e infecção com virus leste são repetidos. Um novo lote de 14 cobaias mostra que a proteção contra a mesma amostra usada na vacina, em 7 infectadas, é solida e regular contra 1000 e 10000 DLM cerebrais. Mas 7 cobaias do mesmo lote, infectadas pelo virus

leste a 1p.1000 isto é, recebendo 100 - 1000 DLM, morrem todas. Esta série de ensaios, tabela 13, mostra que a vacina preparada da amostra brasileira não protege contra o virus leste.

Si reunirmos os dados das duas últimas tabelas 12 e 13, experiencias n.º 11 e n.º 12, teremos 13 cobaias que revelam imunidade solida contra o virus brasileiro, contra 1000 - 10000 DLM. Por outro lado, de 13 vacinadas com vacina brasileira, morrem 12, quando infectadas com a amostra leste.

TABELA 12

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Vacinação com virus brasileiro

Prova de infecção: Virus leste

Virus brasileiro

Cobaias	Vacinação		Prova de infecção	Result.
110	5-3-43 - 1.ª dose vac. bras. 0,5 cc.	12-3 43 2.ª dose	14-4-43 v. bras. 1p.100	—
111	»	»	» »	—
112	»	»	» »	—
13	»	»	» »	—
14	»	»	» 1p.10	—
15	»	»	» »	—
16	»	»	14-4-43 v. leste 1p.1000	+
17	»	»	» »	+
18	»	»	» »	+
19	»	»	» »	+
20	»	»	» 1p.10000	—
21	»	»	» »	+
CONTROLES				
225			14-4-43 v. bras. 1p.100	+
26			» »	+
223			14-4-43 v. leste 1p. 10000	+
24			» »	+

Em outra experiência do mesmo tipo a dose infectante de virus leste foi reduzida para 1p.10000 sem que tenha sido possível verificar resistência das cobaias vacinadas.

Dentro dos testes habituais de prova de vacinação com vacina apenas, parece claro pois, que uma vacina da amostra brasileira não protege contra o virus leste, mesmo quando êste é utilizado em diluições mais altas, com um número menor de doses infectantes. Contrôles das diversas provas de infecção são acrescentados à tabela n.º 13.

Experiencia n.º 13 — Vacinação com vacina leste. Infecção com virus brasileiro. Aqui é necessário assinalar que encon-

tramos, como já foi dito, grande dificuldade em proteger cobaias regularmente, contra o mesmo virus leste, com as doses habituais de vacina empregadas em todos os outros testes. Às vezes, em ensaios preliminares de valor antigenico de vacinas leste, um resultado favoravel era obtido: em 4 cobaias vacinadas, a prova de infecção mostrava que uma morria e tres resistiam. Mas quando os ensaios eram prossegui-

TABELA 13

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Repetição das experiências da tabela 12

Cobaias	Vacinação	Prova de infecção	Result.
393	8-6-43 vac. bras. 21-6143 - 2.a dose 1.ª dose	20-7-43 v. bras. 1p.10	—
94	» »	» »	—
95	» »	» »	—
96	» »	» »	—
97	» »	» »	—
98	» »	» »	—
99	» »	» »	—
400	» »	19-7-43 v. leste 1p.1000	+
401	» »	» »	+
402	» »	» »	+
403	» »	» »	+
404	» »	» »	+
405	» »	» »	+
406	» »	» »	+
CONTROLES			
530		20-7-43 v. bras. 1p.10	+
31		» »	+
411		19-7-43 v. leste 1p.1000	+
12		» »	+

dos, os resultados irregulares apareciam com frequencia. Foi necessário inocular várias doses de vacina, 1cc — 2cc — 3cc para conseguir proteção solida à prova cerebral com o mesmo virus.

Em uma primeira série, tabela 14, 6 cobaias são vacinadas com vacina leste em 4 doses, sendo o volume total de vacina 3cc. Cêrca de duas semanas mais tarde, a prova de infecção mostra que 3 resistem ao virus leste a 1p.1000 e as outras três resistem ao virus brasileiro a 1p.100.

TABELA 14

IMUNIDADE CRUZADA: TIPO LESTE — AMOSTRA BRASILEIRA

Vacinação com virus leste

Cobaias	Vacinação				Prova de infecção	Result.
276	4-5-43 vac. leste 1.ª dose 0,5 cc	12-5-43 2.ª dose	25-5-43 3.ª dose 1 cc	9-7-43 4.ª dose 1 cc	22-7-43 v. leste 1p.1000	—
77	» »	»	»	»	» »	—
78	» »	»	»	»	» »	—
79	» »	»	»	»	26-7-43 v. bras. 1p.100	—
80	» »	»	»	»	» »	—
81	» »	»	»	»	» »	—
CONTROLES						
536					22-7-43 v. leste 1p.1000	+
37					» »	+
365					26-7-43 v. bras. 1p.100	+
66					» »	+

Aqui se veem cobaias que, protegidas contra o virus leste resistem ao virus brasileiro mesmo recebendo apenas vacina. Ha aí uma demonstração clara de relação imunológica.

TABELA 15

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Vacinação com virus leste

Cobaias	Vacinação			Prova de infecção	Result.
353	4-6-43 vac. leste 1.ª dose 1 cc	10-6-43 1 cc 2.ª dose	9-7-43 1 cc 3.ª dose	22-7-43 v. leste 1p.1000	—
54	»	»	»	»	—
55	»	»	»	1p.100	—
56	»	»	»	»	+
57	»	»	»	»	+
58	»	»	»	»	—
59	»	»	»	26-7-43 v. bras. 1p.100	—
60	»	»	»	»	—
61	»	»	»	»	—
62	»	»	»	»	—
63	»	»	»	»	—
64	»	»	»	»	—
CONTROLES					
	Os mesmos da tabela anterior				

Verifica-se que cobaias, mesmo quando parcialmente protegidas contra o virus leste, estão regularmente protegidas contra o virus brasileiro. A combinação destas duas tabelas 14 e 15 mostra claramente que o virus leste protege solidamente contra a amostra brasileira.

Aquí se vê, que a vacina do tipo leste protege contra a amostra brasileira. Há aqui uma relação imunologica evidente.

Experiencia n.º 14 — Em uma nova série, tabela 15, 12 cobaias recebem vacina leste em três doses de 1cc. Quando a prova de infecção é realizada, verifica-se que mesmo cobaias protegidas contra o virus leste na relação 4/6 — quando são infectadas com o virus brasileiro, todas revelam resistencia.

TABELA 16

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Cobaias solidamente imunizadas: Vacina + virus

Cobaias	Vacinação			Prova de infecção	Result.
	Vacina	Vacina	Virus		
387	8-6-43 vac. bras. 1.ª dose 0,5 cc	21-6-43 2.ª dose	13-7-43 v. bras. 1p.100 —	21-8-43 v. leste 1p.1000	+
88	»	»	» » —	» »	+
89	»	»	» 1p.10 —	» »	—
90	»	»	» » —	» »	+
91	»	»	» 1p.100 —	» »	+
92	»	»	» » —	» »	+
93	»	»	» 1p.10 —	2-9-43 v. bras. 1p.10	—
94	»	»	» » —	» »	—
95	»	»	» » —	» »	—
97	»	»	» » —	» »	—
98	»	»	» » —	» »	—
99	»	»	» » +		
CONTROLES					
407			13-7-43 v. bras. 1p.100 +		
408			» » +		
626				21-8-43 v. leste 1p.1000	+
27				» »	+
582				2-9-43 v. bras. 1p.10	+
83				» »	+

Nesta experiência verifica-se que cobaias solidamente protegidas contra o virus brasileiro, isto é, que receberam vacina por via subcutânea e virus por via cerebral, quando provadas em face do virus leste não resistem. O lote reinfectado em 2-9-43 com virus brasileiro mostra que não houve queda da imunidade em relação ao mesmo virus quando foi realisada a infecção com virus leste.

Decorre dessas duas experiencias, 13 e 14, que a vacinação contra o virus leste vale contra a amostra brasileira regularmente, mesmo com o uso apenas da vacina por via subcutanea.

Experiencia n.º 15 — Imunização com vacina brasileira + virus. Um lote de 12 cobaias, tabela 16, recebe duas doses de vacina brasileira e mais tarde virus da mesma amostra no cerebro. Todas resistem e estão pois solidamente imunizadas.

A prova de infecção com virus leste, cêrca de 40 dias mais tarde, mostra que em seis inoculadas com virus a 1p.1000 cinco morrem. As cinco outras do mesmo lote, reinfectadas com o virus brasileiro, mostram que não houve queda da imunidade no momento em que foi feita a prova com o virus leste.

TABELA 17

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Cobaias solidamente imunizadas: vacina + virus brasileiro

Cobaias	Imunização			Prova de infecção	Result.
	vacina	vacina	virus		
110	5-3-43 vac. bras. 1.ª dose 0,5 cc	12-3-43 0,5 cc 2.ª dose	14-4-43 v. bras. 1p.100	11-5-43 v. leste 1p.1000	+
11	»	»	» »	» »	—
12	»	»	» »	» »	—
13	»	»	» »	» »	—
14	»	»	1p.10	1p.10000	—
15	»	»	» »	» »	+

CONTROLES

225		14-4-43 v. bras. 1p.100 +		
26		» » +		
37			11-5-43 v. leste 10^{-6}	—
38			» »	—
39			» » 10^{-5}	+
40			» »	+
41			» » 10^{-4}	+
42			» »	+
43			» » 10^{-3}	+
44			» »	+

A cobaia 115 teve uma incubação de 84 horas contra incubação de 36-42 horas das cobaias de controle.

E' êste o primeiro resultado favoravel de proteção da amostra brasileira contra virus leste.

Experiencia n.º 16 — O mesmo ensaio anterior é renovado na experiencia da tabela 17. Seis cobaias são vacinadas com vacina brasileira e virus. Cêrca de um mês depois, recebem virus leste: duas morrem e quatro resistem.

Este último ensaio é o unico em que foi possivel verificar proteção da amostra brasileira contra o virus leste. Mas como se vê ainda assim, trata-se de uma proteção incompleta. Como vimos nos ensaios anteriores, a prova em contrario é sempre bem sucedida, isto é, o virus leste protege facilmente contra a amostra brasileira.

Experiencia n.º 17 — Tentamos ainda verificar si a vacinação contra o virus brasileiro com doses mais altas de vacina, seria eficaz contra o virus leste. Os resultados dêste ensaio mostram que cobaias protegidas contra o virus brasileiro com duas doses de 0,5cc da vacina, ainda não estão protegidas contra o virus leste a 1p.

1000 quando a dose de vacina é elevada para 3cc em duas inoculações de 1cc e 2cc.

Aquí aparece a utilidade dos testes de proteção por meio de vacina e virus, pois só por meio deles foi possivel surpreender uma proteção, embora inconstante, da amostra brasileira contra o virus leste.

TABELA 18

IMUNIDADE CRUZADA: VIRUS LESTE — VIRUS BRASILEIRO

Cobaias solidamente imunizadas: vacina + virus leste

Cobaias	Imunização			Prova de infecção	Result.
	vacina	vacina	virus		
22	1.ª dose vac. leste	2.ª dose 0.5 cc	Virus leste 1p.1000	V. bras. 1p.100 — 22 dias depois	—
23	»	»	» »	»	—
24	»	»	» »	»	—
25	»	»	» »	»	—
26	»	»	» »	»	+
27	»	»	» 1p.100	»	—
28	»	»	» »	»	—
CONTROLES					
43			virus leste 1p.1000 +		
44			» » +		
305				v. bras. 1p.100	+
306				»	+

Experiencia n.º 18 — Na tabela 18 estão resumidos os resultados dêstes ensaios, onde se vê que cobaias protegidas pela vacina leste mais virus, resistem à amostra brasileira. Êste resultado nada tem de surpreendente e era mesmo previsivel, uma vez que, como está visto em vários ensaios, a vacina leste protege contra o virus brasileiro.

*

* *

EM RESUMO:

Dessa longa série de ensaios de imunidade cruzada, algumas conclusões podem ser tiradas quanto à posição imunologica da amostra brasileira do virus, comparada com os três tipos até agora identificados no Continente.

Trabalhamos com dois tipos de ensaios e quatro amostras de comparação. Protegendo com vacinas por via subcutanea, para infecta-las com o virus homologo e com o virus a identificar. E protegendo cobaias com vacinas do virus a tipar para prová-las em face dos diversos tipos conhecidos.

De outro lado, protegendo cobaias com vacinas, e reforçando, ou tentando reforçar essa imunidade por meio da inoculação de virus por via cerebral, para depois realizar a prova de infecção.

As conclusões são as seguintes.

1 — Não há relação imunologica, em face dos dois tipos de experiencias, da amostra brasileira com o tipo oeste americano, isto é, com a amostra argentina e californiana, que pertencem ao mesmo tipo.

Como se vê, as duas séries de experiencias, utilizando técnicas de proteção por meio de vacina mais virus, completam e reforçam as conclusões das outras, realizadas por meio apenas da vacina.

Além disso, os ensaios com a amostra argentina e com a amostra californiana são ainda de resultados identicos.

2 — Os ensaios de imunidade cruzada com o virus da Venezuela permitem ver que não há relação imunologica da amostra brasileira com êsse virus. A imunidade contra a amostra brasileira não prevalece contra o virus venezuelano, nem a imunidade contra êste prevalece contra aquela. Apenas parece haver uma proteção do grupo, que não é cruzada, quando cobaias imunizadas com vacina mais virus da Venezuela, resistem ao virus brasileiro. Este fato deve estar ligado à relação imunologica mais estreita que o virus da Venezuela parece ter com o leste, conforme se depreende dos ensaios de BECK e WYCKOFF.

Os tipos de virus da encefalomielite do cavalo podem ser considerados como apresentando diferenças imunologicas nítidas, mas, ao lado disso, pontos de contacto muito estreitos que os aproximam. Essas diferenças, que permitem separá-los, assim como os pontos de contacto, que permitem agrupá-los, fazem pensar, segundo HOWITT, (17) num grupo originário comum, fornecendo variedades de virus mais ou menos diferenciadas. No estado atual do assunto, parece que os tipos leste e oeste são os mais diferenciados, sendo o venezuelano mais aproximado do leste.

3 — Em relação ao tipo leste, as relações imunologicas da amostra brasileira são muito estreitas, embora incompletas, como se vê nas séries de ensaios realizados com êste tipo.

Nos ensaios de proteção da vacina leste verifica-se logo que a vacinação por via subcutanea prevalece logo contra o virus brasileiro. Cabe porém insistir no fato da amostra leste, em duas doses de vacina, nos ter dado, com frequencia, proteção incompleta e irregular. Foi sempre necessário um maior número de doses vacinantes para proteger contra o tipo leste. E as cobaias assim protegidas contra leste estão protegidas contra o virus brasileiro. Quando as cobaias recebem vacina leste seguida de virus no cerebro, com maiores razões, estão protegidas contra o virus brasileiro.

Mas, a proteção contra a amostra brasileira, de um modo geral e nas condições normais, isto é, assegurada fácil e prontamente por meio de duas doses de vacinas, contra 1000 — 10000 DLM, não prevalece nessas condições contra o tipo leste. Todas as cobaias dêste modo regularmente protegidas contra o virus brasileiro não o estão contra o virus leste.

Mesmo no segundo tipo de ensaio, isto é, protegendo cobaias com vacinas brasileiras mais virus, — a proteção contra o virus leste não é assegurada sinão de modo incompleto.

Não se poderia supôr que essa diferença resulte de um poder antigenico baixo da amostra brasileira, pois os ensaios numerosos, com sete partidas de vacina, fornecendo o título de embriões inoculados de 10^{-7} — 10^{-8}, mostram que essas vacinas protegem contra 1000 - 10000 DLM da amostra brasileira.

As séries de ensaios aqui referidos permitem pois assinalar que o virus brasileiro não pertence ao tipo oeste, nem ao venezuelano, mas tem relações imunologicas muito estreitas, embora incompletas, com o virus leste. A vacinação contra leste vale contra a amostra brasileira. Mas a proteção prontamente assegurada contra a amostra brasileira, não vale contra o virus leste.

Outros generos de experiencias permitirão explorar o problema sob outros aspectos, procurando esclarecer a natureza das diferenças aqui assinaladas.

Contra a amostra aqui isolada pode-se porém dispôr de uma excelente vacina protegendo solidamente em numerosos testes realizados.

CONCLUSÕES

O virus da encefalomielite infecciosa do cavalo, isolado em 1937 em São Paulo, de um surto verificado no municipio de Tatuí, vem sendo conservado por passagens cerebrais pela cobaia e conta atualmente 80 passagens, matando a cobaia em 3-4 dias.

Em cerebro de cobaia o virus é infectante para cobaia a 1p. 10000 e mais raramente a 1p.100000. No camondongo os resultados são mais ou menos identicos.

Foi realizada com sucesso a cultura do virus em embrião de pinto, por inoculação na membrana corioalantoide, dando titulos infectantes altos, 10^{-7} — 10^{-8} para cobaia, por via cerebral.

As culturas de embrião de pinto formoladas, de acôrdo com a técnica dos autores norte-americanos, fornecem uma vacina protegendo cobaias contra 1000 e 10000 DLM cerebrais.

Na geladeira a + 4° C. a vacina conserva o seu poder antigenico até pelo menos 8-10 meses.

Ensaios de imunidade cruzada foram realizados usando duas técnicas de trabalho: protegendo as cobaias por meio de vacinas por via subcutanea, e protegendo-as por meio de vacinas por via subcutanea seguidas de virus por via cerebral, antes de realizar a prova de infecção. No conjunto, essas duas técnicas de trabalho dão resultados interessantes e se completam. Ensaios foram feitos:

1 — com duas amostra do tipo oeste, uma californiana e uma argentina;
2 — com uma amostra da Venezuela;
3 — com uma amostra do tipo leste.

Não foi possivel verificar relações de imunidade cruzada da amostra brasileira com a amostra argentina, que pertence ao tipo oeste. Os ensaios repetidos com a amostra oeste, da California, fornecem resultados identicos. Nem o tipo oeste protege contra a amostra brasileira, nem esta protege contra aquele tipo.

Do mesmo modo, no conjunto, resultados similares foram obtidos nos ensaios de imunidade cruzada com o virus da Venezuela. Apenas, em cobaias solidamente imunizadas contra êste último virus, por meio de vacina mais virus, há uma certa proteção contra a amostra brasileira, o que parece devido a uma relação imunologica do grupo. Mas o contrario não se verifica, isto é, cobaias solidamente imunizadas contra a amostra brasileira não o estão contra o virus da Venezuela.

Em relação ao tipo leste, as relações imunologicas são muito mais estreitas, embora incompletas.

As cobaias protegidas contra a amostra leste estão sempre e regularmente protegidas contra a amostra brasileira, suportando inoculações de 1000 — 10000 DLM dêste último virus.

Mas as cobaias protegidas contra a amostra brasileira, que suportam o mesmo virus a 1p.10, correspondendo a 1000 — 10000 DLM, de um modo geral, não estão protegidas contra o virus leste. Mesmo as cobaias que recebem vacina brasileira em maiores doses não estão ainda protegidas contra o virus leste.

Nas cobaias protegidas contra a amostra brasileira por meio da vacina por via subcutanea e virus por via cerebral, — quando se realiza a prova de infecção pelo virus leste, ainda a proteção contra o virus brasileiro é parcial ou irregular contra o virus leste, embora inoculado a 1p.100, quando o virus brasileiro é sempre usado a 1p.10 nas provas de infecção.

Existem pois, aí relações imunologicas estreitas, mas, igualmente, diferenças evidentes, embora elas pareçam apenas quantitativas.

A amostra brasileira apresenta outros dados que a distanciam do tipo leste clássico, como periodo de incubação na cobaia, sendo de 4-5 dias ou mesmo de 3 dias e não de 40-42 horas ou mesmo 36 horas. A evolução da doença é do mesmo modo mais lenta.

Em face dêsses resultados, parece que a amostra brasileira deverá ser classificada como uma variante do tipo leste.

Os vários testes de valor antigenico de sete partidas de vacinas preparadas da amostra brasileira mostram que as culturas de embrião de pinto, fornecendo titulos de 10^{-7} — 10^{-8}, fornecem uma vacina que, em duas doses de 0.5 cc, protege a cobaia contra 1000 — 10000 DLM e que nessas condições a profilaxia pela vacinação poderá ser assegurada nas regiões onde o mesmo virus se verificar.

O problema da vacinação, em outras regiões do País, principalmente, reclamará, para o futuro, o isolamento de amostras de várias regiões no sentido de verificar si outros tipos aqui se encontram, como se deve supôr em vista do mapa de distribuição de tipos, já avançado, nos Estados Unidos.

STUDIES ON INFECTIOUS EQUINE ENCEPHALOMYELITIS IN BRAZIL

Abstract

The virus of infectious equine encephalomyelitis isolated in 1937 in S. Paulo is being carried through intracerebral passages in guinea pigs, totaling 80 passages by now, the guinea-pig being killed in 3-4 days.

In guinea-pig brain centrifugated saline suspension the virus is infective for the guinea-pigs and mice at 1/10000 and, occasionaly, at 1/100000.

Virus culture in chick embryo gave highly infectious titers, 10^{-7} - 10^{-8} for the guinea-pig, by intracerebral inoculation.

The formolized chick embryo cultures according to the technique of North-American authors, produce a vaccine immunizing guinea-pigs against 1000 and 10000 lethal intracerebral doses.

In the ice-box at + 4° C the antigenic power of the vaccine is preserved for at least 8-10 months.

Cross immunity tests were performed following two techniques: subcutaneous inoculation of guinea-pigs with vaccine or subcutaneous inoculation of vaccine followed by brain inoculation of virus. For the tests were employed 1) two Western strain viruses, one Californian and one Argentine; 2) a Venezuelan virus; 3) an Eastern strain.

It was not possible to disclose cross immunity relationship between the Brazilian and the Argentine virus which belongs to the Western type. The tests repeated with the Californian strain show the same results.

Similar results on the whole were obtained with the cross immunity tests undertaken with the Venezuelan virus. However, in guinea-pigs solidly immunized against the latter virus, with vaccine and virus, there is a certain protection against the Brazilian virus. This seems to be due to a certain immunological group relationship. The contrary does not occur, i. e. guinea-pigs solidly immunized against the Brazilian virus do not acquire protection against the Venezuelan virus.

As to Eastern strain, the immunological relationsphip is much closer, though incomplete.

The guinea-pigs immunized against the Eastern strain are regularly protected against the Brazilian strain, but the guinea-pigs immunized against the Brazilian strain are not always protected against the Eastern virus.

In guinea-pigs protected against the Brazilian strain by means of vaccine and virus the infection test performed with the Eastern strain still shows that immunity is partial or incomplete.

Thus it is apparent that there exists close immunological relationship but equally obvious differences, although they seem to be only quantitative.

The Brazilian strain offers other properties which differentiate it from the classic Eastern strain, such as: a) the incubation period in the guinea-pig, which is of 4-5 days or even 3 1/2, instead of 40-42 hours or 36 hours, and b) the course of the disease, which is of longer duration with the Brazilian virus.

In the light of the results described, it seems that the Brazilian strain should be classified as a variety of the Eastern type.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bang, F. — 1943 — The course of experimental infection of the chick embryo with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 77: 337-344.

2 — Beard, D., H. Finkelstein and J. Beard — 1941 — Repeated vaccination of man against the virus of equine encephalomyelitis. *J. Immunology*, 40: 497-507.

3 — Beard, J. W., H. Finkelstein, W. C. Sealy and R. W. G. Wyckoff — 1938 — Immunization against equine encephalomyelitis with chick embryo vaccine. *Science*, 87: 490.

4 — Beck, C. E. and R. W. G. Wyckoff — 1938 — Venezuelan equine encephalomyelitis. *Science*, 88: 530.

5 — BURNET, F. M. — 1936 — The use of developing egg in virus research. *Special Report Series*, n.º 220, 50 pp. — *Med. Research Council*, London.

6 — BURNET, F. M. — 1938 — The growth of viruses on the chorioallantois of chick embryo. In *Handbuch der Virusforschung*, Erste Hälfte, 419-446. Wien. Verlag von Julius Springer.

7 — CARNEIRO, V. — 1937 — A encephalomyelite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 115-134.

8 — CARNEIRO, V. — 1939 — Equine encephalomyelites in Brazil. *Proc. Sixth Pacific Sc. Congress*, 5: 251-258.

9 — COX, H. R. and P. K. OLITSKY — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. II — Immunisation with formolised virus. *J. Exp. Med.*, 63: 745-767.

10 — EICHHORN, A. and R. W. G. WYCKOFF — 1938 — Immunological studies on equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 93: N. S. 46: 285-290.

11 — GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1933 — The immunological relationship of Eastern and Western strains of equine encephalomyelitis virus. *Science*, 78: 587-588.

12 — GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1933 — The 1933 outbreak of infectious equine encephalomyelitis in the eastern states. *Nth. Am. Vet.*, 14: 25-27.

13 — GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1936 — The present status of infectious equine encephalomyelitis in the United States. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 88: 363-374.

14 — GRAHAM, R. and L. NORMAN — 1941 — Studies on equine encephalomyelitis. I — Antigenic properties of pigeon - brain - tissue vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 2: 430-435.

15 — HENNING, M. W. — 1932 — Animal Diseases in South Africa, vol. 1.º, p. 254. Central News Agence, Limited. South Africa.

16 — HIGBIE, E. and B. HOWITT — 1935 — The behavior of the virus of equine encephalomyelitis on the chorioallantoic membrane of the developing chick. *Jour. of Bact.*, 29: 399-406.

17 — HOWITT, B. — 1935 — An immunological study in laboratory animals of thirteen different strains of equine encephalomyelitis virus. *J. Imm.*, 29: 319-341.

18 — HOWITT, B. — 1938 — The Moscow 2 strain of equine encephalomyelitic virus as compared with other strains of equine encephalitic viruses. *J. Infect. Dis.*, 63: 269-286.

19 — KUBES, V. and A. DIAMANTE — 1942 — Estudios de imunización cruzada entre el virus de la encefalomielitis equina y los virus encefalomieliticos este, oeste y argentino. *Bol. Ins. Investig. Vet.*, 1: 49-79.

20 — KUBES, V. and F. RIOS — 1939 — The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science*, 90: 20-21.

21 — LYON, B. M. and R. W. G. WYCKOFF — 1938 — Chick Vaccine for Equine Encephalomyelitis. *Vet. Med.*, 33: 408-409.

22 — MEYER, K. F., C. M. HARING and B. F. HOWITT — 1931 — The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, 1930. *Science*, 74: 227-228.

23 — MEYER, K. F., C. M. HARING and B. F. HOWITT — 1931 — Newer knowledge of the neurotropic virus infections of the horse. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 79: 376-389.

24 — Meyer, K. F., F. Wood, C. M. Haring and B. Howitt — 1934 — Susceptibility of Non-Immune, Hyperimmunized Horses and Goats to Eastern, Western and Argentine Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32: 56.

25 — Mohler, J. R. — 1943 — Report on infectious equine encephalomyelitis in the U. S. A. in 1942. *U. S. D. Agr.*, Washington, D. C.

26 — Olitsky, P. and I. M. Morgan — 1939 — Studies on active and passive immunity resulting from inoculation formolized inactivated and of active virus of equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med.*, 95: 530-533.

27 — Randall, R. — 1940 — The preparation of equine encephalomyelitis vaccine (chick) by the Army Vet. School. *Vet. Bull. U. S. Army*, 34: 7-12.

28 — Randall, R. and E. A. Eichhorn — 1941 — Westward Spread of Eastern Type Equine Encephalomyelitis Virus. *Science*, 93: 595.

29 — Records, E. and L. R. Vawter — 1934 — Equine encephalomyelitis cross-immunity in horses between Western and Eastern strains of virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 38: 89-95.

30 — Records, E. and L. R. Vawter — 1935 — Equine encephalomyelitis cross-immunity in horses between Western and Eastern strains of virus. Supplement Report. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 39: 773-777.

31 — Rosenbusch, F. — 1933 — Estudios etiológicos de la epizootía de Encefalomielitis de los equinos en la Argentina. — *Octava reunión de la Soc. Argentina de Pat. Reg. del Norte.*, 2-3 oct. 1933, Santiago del Estero. Segunda mitad: 572-576.

32 — Rosenbusch, F. — 1934 — La imunización activa con el virus de la encefalomielitis infecciosa en la Argentina. Estudio comparativo con el virus californiano. *An. Soc. Rur. Aregntina*, 68: 373-376.

33 — Schoening, H. W. — 1939 — Equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 95: 268-272.

34 — Schoening, H. W., M. S. Shahan, O. L. Osteen and L. T. Giltner — 1940 — Studies of the Intradermal Method of Vaccination against Equine Encephalomyelitis. *Vet. Med.*, 35: 377-380.

35 — Schoening, H. W., M. S. Shahan, L. T. Giltner and O. L. Osteen — 1942 — Duration of Immunity from Encephalomyelitis Vaccination. *Vet. Med.*, 37: 397.

36 — Schoening, H. W., M. S. Shahan, L. T. Giltner and O. L. Osteen — 1943 — The longevity of Encephalomyelitis Immunity indured in Horses by Vaccination. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 102: 18-21.

37 — Schwarte, L. H. — 1938 — Moldy corn poisoning in horses. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 45: 152-158.

38 — Schwarte, L. H., H. E. Biester and C. Murray — 1937 — A disease of horses caused by feeding moldy corn. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 43: 76-85.

39 — Shahan, M. S. and E. A. Eichhorn — 1941 — Studies of Chick-Embryo-Propagated Equine Encephalomyelitis Virus and Vaccine: Antigenicity and Preservation. *Am. J. Vet. Res.*, 2: 218-220.

40 — Shahan, M. S. and L. T. Giltner — 1934 — Some aspects of infection and immunity in equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 37: 926-934.

41 — Shahan, M. S. and L. T. Giltner — 1935 — Experimental studies on Equine Encephalomyelitis Formolised Tissue Vaccine. *The North Am. Vet.*, 16: 18-26.

42 — SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1935 — Equine encephalomyelitis studies: 1 — Cross-immunity tests between Eastern and Western Types of Virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **39**: 764-772.

43 — SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1943 — Identity of virus from cases of Equine Encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **102**: 271-275.

44 — SHAHAN, M. S., L. T. GILTNER and O. L. OSTEEN — 1940 — The isolation and typing of equine encephalomyelitis virus. *The Cornell Vet.*, **30**: 151-160.

45 — TAYLOR, A. R., D. G. SHARP, D. BEARD, H. FINKELSTEIN and J. W. BEARD — 1940 — Concentration and partial purification of equine encephalomyelitis vaccines. *Science*, **92**: 586-587.

46 — TEN BROECK, C. and M. H. MERRILL — 1933 — A serological difference between Eastern and Western equine encephalomyelitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **31**: 217-220.

47 — WOODRUFF, A. and E. GOODPASTURE — 1931 — The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chinck embryos to infection with the fowlpox virus. *The Am. J. of Path.*, **7**: 209-222.

Vol. 14 — Art. 11 Dezembro de 1948

SOBRE ALGUNS PRECONCEITOS MORFOLÓGICOS NO GÊNERO "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" E SUA SIGNIFICAÇÃO TAXONÔMICA

POR

C. Pereira e W. F. de Almeida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Este trabalho representa uma tentativa de revisão e crítica dos dados fundamentais sobre a morfologia geral das espécies do gênero *Trichomonas* DONNÉ, 1836; sua realização impôs-se como tentativa de harmonizar os dados clássicos da literatura, baseados principalmente no exame de preparações fixadas a úmido e coradas pelas lacas férricas dos derivados da hematoxilina, com os resultados das nossas investigações, realizadas quasi exclusivamente em preparações fixadas a seco e coradas por misturas do tipo Romanowsky, técnica que se revelou, em nossas mãos, muito mais produtiva que a primeira.

Pensamos que o esclarecimento definitivo dos pormenores morfológicos aqui discutidos será de grande utilidade para a racionalização da sistemática das espécies do gênero, pois é frequente na literatura a atribuição de valor taxonômico a estruturas que ora são meros artefactos de técnica, ora ocorrências inteiramente ocasionais e que, sancionadas pela tradição, levam os pesquisadores menos avisados a contribuir para que se eternize a balbúrdia existente na delimitação das espécies destes flagelados.

Alem disso, tem este trabalho, até certo ponto, o carater de introdução, em relação a outros, sobre sistemática, que estão sendo elaborados, pois estabelece nosso ponto de vista sobre o assunto, permitindo apreciavel economia de espaço para o futuro, não só por tornarem-se supérfluas novas discussões da morfologia geral do gênero, como por esclarecer a nossa orientação no estudo morfológico deste grupo de flagelados.

Quanto aos métodos, são os mesmos que utilizamos para o nosso trabalho de 1940; ao passo que o material constou de tricômonas provenientes de homem, cobaia, carneiro, galinha, pombo, cobras, lagartos, sapos e rãs.

GRÂNULOS CROMÁTICOS

As lacas dos derivados da hemateina com os complexos mercuriais que se formaram no citoplasma, no decorrer da fixação, conduzem frequentemente ao aparecimento dos denominados "grânulos cromáticos", ora dispersos em desordem pelo citoplasma, outras vezes

mais ou menos ordenados; quando dispostos com certa ordem, receberam denominações particulares, de acordo com a situação ocupada, tais como: "grânulos paracostais", "grânulos internos do axostilo" e "grânulos justapostos ao axostilo". Outros "grânulos cromáticos" nada mais são que bactérias situadas nos vacuolos digestivos.

Tais grânulos podem aparecer em logar da fibra costal, tendo a mesma situação que ela e isso pode ser explicado pela coloração deficiente e irregular dessa fibra.

WENRICH e EMMERSON (1933) e WENRICH (1939) atribuiram-lhes a significação de carater específico, ao passo que HEGNER & RATCLIFFE (1927) não conseguiram reconhecer neles nenhuma regularidade particular, opinião que partilhamos, pois não vemos em tais grânulos outra coisa sinão artefactos de técnica, por não serem evidenciaveis após fixação por dessecamento e coloração pelo método Romanowsky.

PEDÚNCULOS

É frequente encontrarem-se grupamentos mais ou menos numerosos do protozoário, principalmente ao redor de partículas; em tais casos, dos quais STABLER (1941) dá bôa figura esquemática de conjunto, não se trata da associação por meio de "pedúnculos", como quer esse autor, mas sim das "formas senescentes" de PEREIRA & ALMEIDA (1940), o que foi confirmado elegantemente por HOGUE (1943); elas se caracterizam essencialmente por acentuada redução dos diâmetros do corpo, possivelmente devido a uma deshidratação do animal, em virtude do que a porção livre do axostilo se torna relativamente mais longa que de hábito, simulando o referido "pedúnculo". Não procede o argumento de STABLER, da origem geralmente lateral dos flagelos em tais casos, pois devido ao frequente encurvamento do axostilo no interior do animal, o ponto de sua emergência costuma distar do blefaroplasto menos de 180°, sendo muito frequentes os ângulos de cerca de 90°, como se vê na figura n.° 88, página 355, do nosso trabalho de 1940.

A esta questão está intimamente ligada a do comprimento relativo do axostilo, ao qual tem sido frequentemente atribuido o papel de carater específico, o que é invalidado pelas considerações feitas acima.

CITÓSTOMA

Entre as falsas estruturas dos tricômonas, poucas terão sido assinaladas tantas vezes como o citóstoma, não havendo tratado sobre o assunto que não reproduza uma bonita figura desse interessante malentendido. Na excelente divulgação de protozoologia feita por HEGNER (1938), popularizou-se o conceito de tricômonas como possuido-

res de bôca, o que lhes confere um pitoresco que infelizmente não nos é possivel confimar.

Parece-nos que a história do citóstoma nos tricômonas teve início com as primeiras observações de DAVAINE (1875), que, embora concordando com DUJARDIN (1841) ao emendar as interpretações errôneas de EHRENBERG (1838), afirmou que uma de suas observações "porterait à croire que, en effet, les monadiens sont pourvus d'une bouche", opinião que foi partilhada por KÜNSTLER (1884) e GRASSI (1879), seguidas pelas de PERRONCITO (1901), ALEXEIEFF (1909, 1914), PARISI (1910), consolidadas por MARTIN e ROBERTSON (1911) e continuadas por KUCZYNSKI (1914), WENYON (1915) e, principalmente, KOFOID e SWEZY (1915), apoiados por HEGNER e TAGLIAFERRO (1925), CUNHA e MUNIZ (1926), HEGNER e RATCLIFFE (1927), KIRBY (1931), TRAVIS (1932), ALLEN (1936, 1940), FONSECA (1940), STABLER (1941), SAMUELS (1941) e VIDIGAL (1943).

Quanto à sua importância como carater específico, WENRICH (1939) descreve-a em *T. vaginalis* como estrutura pequena, frequentemente fechada, ao passo que POWELL (1936) nega sua existência na mesma espécie.

De acordo com as nossas verificações, o que tem sido designado por "citóstoma" e "citofaringe", não passa de uma deficiência da coloração do axostilo na sua porção justablefaroplástica, fenômeno que costuma estender-se até o nivel do núcleo; como é justamente a este nivel que o axostilo costuma sofrer uma flexão bem acentuada, que chega mesmo a simular uma discontinuidade dessa estrutura, os autores que representam citóstomas e citofaringes em tricômonas só o fazem quando não conseguiram distinguir a porção do axostilo situada entre o núcleo e o blefaroplasto. Há, portanto entre a percepção integral do axostilo e a alegada existência de uma boca nos tricômonas, uma significativa incompatibilidade, que WENRICH (1939) procurou transpor estabelecendo uma ponte, constituida pelo "citóstoma fechado", isto é, pela imagem linear, obtida pela coloração deficiente apenas de uma das margens do axostilo. Essa confusão, mantida por tanto tempo pela fixação a úmido e coloração pela hematoxilina férrica, desfaz-se facilmente pela fixação a seco e coloração pelo método Romanowsky.

Outras formações frequentemente consideradas como citóstoma são as dobras ou pregas do citoplasma, que se formam no momento da fixação, na parte anteroventral dos tricômonas. Tais pregas podem se formar em qualquer ponto do corpo destes flagelados, mas quando existentes na região assinalada são consideradas como "citóstoma de lábio saliente". Essa formação foi assinalada como citóstoma autêntico,

por exemplo, nas descrições originais de *Trichomonas macrostoma* DOGIEL, 1916 e *Trichomonas labelli* KIRBY, 1931.

Ocasionalmente temos verificados tais pregas em todas as espécies de tricômonas com que trabalhámos. A variabilidade extrema de tal formação e sua presença apenas em raros exemplares indicam tratar-se de um artefacto de técnica.

ESTRUTURA DO AXOSTILO

O "bastoncino" referido por PERRONCITO (1901), como estendendo-se em linha curva de um polo ao outro do protozoário, acompanhado de dupla fileira de grânulos, foi denominado axostilo por DOBELL (1909); MARTIN e ROBERTSON (1911) viram-no cheio de grânulos cromáticos, ponto de vista que foi acentuado por KOFOID e SWEZY (1915), tendo sido adotado desde então por grande número de pesquisadores, e que discutimos em outra parte deste trabalho.

Já nos referimos à fraca colorabilidade do axostilo, pelas lacas ferrosas de hematoxilina, particularmente na sua extremidade anterior, o que em absoluto não constitue um caracter específico como pretenderam muitos. Este fato levou a generalidade dos autores a acreditar na existência de um citóstoma, o que já demonstramos ser improcedente.

Ainda quanto à colorabilidade do axostilo assinalamos que este orgânulo pode se apresentar pouco corado em toda sua extensão, sendo nesse caso denominado "hialino", como, por exemplo, na redescrição que KOFOID e SWEZY (1915) fizeram de *Trichomonas augusta* ALEXEIEFF, 1911; outras vezes cora-se intensamente e é designado como "grosso e profundamente corado", como por exemplo na descrição original de *Trichomonas didelphidis* HEGNER & RATCLIFFE, 1927; tambem se pode corar apenas uma de suas margens, motivo pelo qual é então considerado "filamentoso", como, por exemplo, na descrição original de *Trichomonas canistomae* HEGNER & RATCLIFFE, 1927 e em muitas descrições de *Trichomonas vaginalis* DONNÉ, 1836. Tais "tipos" de axostilo teem sido às vezes considerados como tendo valor específico, isso porque as descrições são baseadas em geral em uma única lâmina corada mais ou menos intensamente por uma laca ferrosa de hematoxilina, onde a diferenciação foi levada a um grau maior ou menor; ou então mesmo tendo sido observadas várias lâminas, podem todas elas ter sido coradas e diferenciadas até o mesmo grau. Preferimos abster-nos de interpretar o "axostilo brilhante, semelhante a um tubo de gás neon, constituindo como que a espinha dorsal de um flagelado pseudo-metamerizado", pois na falta de figura elucidativa foi-nos

materialmente impossivel fazer idéia da curiosa estrutura vista por VIDIGAL (1943).

Observando tricômonas do homem, de cobaias, de carneiros, de galinhas, de pombos, de cobras, de lagartos, de sapos e de rãs, corados pelo método de Romanowsky, verificamos que o axostilo tem sempre o mesmo aspecto geral alongado, fusiforme, mais corado nas bordas que no centro e ainda alargado e menos intensamente corado na porção justanuclear ("capitulum").

Outra formação relacionada com o axostilo são os seus grânulos posteriores, no ponto em que o axostilo passa do citoplasma para o exterior, vistos por KOFOID e SWEZY (1915) em alguns indivíduos apenas, e em número variavel, e cuja significação nos parece a mesma dos outros grânulos cromáticos. A este propósito, WENRICH (1921) creou o conceito de anel cromático, como complemento aos grânulos visto pelos dois autores precedentes o que tambem não conseguimos confirmar.

MEMBRANA ONDULANTE

Este orgânulo dos tricômonas deu margem a grandes divergências entre os diferentes autores.

Nos esfregaços, o flagelo marginal pode aparecer destacado da membrana ondulante, e assim temos um aspecto de *Eutrichomastix*, conforme demonstramos em 1940.

O gênero *Eutrichomastix* KOFOID & SWEZY, 1915 tem sido ora aceito, ora não aceito pelos diferentes autores que se ocuparam do assunto. Assim, MINCHIN (1917) acredita que devam ser duas fases do desenvolvimento do mesmo organismo, pois são frequentemente encontrados no mesmo hospedeiro.

CHATTON (1920) refere ter verificado a libertação do flagelo marginal em culturas de tricômonas de cobaia. CRASSÉ (1926) obteve o descolamento do flagelo marginal, colocando *Trichomonas colubrorum* em solução hipotônica de Ringer com pH entre 7,5 e 8; por isso este autor acredita que possam ser fundidos os gêneros *Trichomonas* DONNÉ, 1836 e *Eutrichomastix* KOFOID & SWEZY, 1915.

Entretanto outros autores, cultivando várias espécies de *Trichomonas*, não conseguiram verificar aspectos de *Eutrichomastix*. DAS GUPTA (1936), trabalhando em culturas de uma linhagem pura de *Trichomonas* de *Boa*, verificou em preparações fixadas e coradas, o aparecimento ocasional de formas nas quais o flagelo marginal se havia destacado da membrana ondulante.

Este autor refere nunca ter observado tais formas a fresco e por isso acredita serem elas acidentais e artificiais. BISHOP (1931 e 1939), tendo cultivado várias espécies de *Trichomonas*, tambem não

encontrou formas de *Eutrichomastix*. Esta autora dá grande valor sistemático à fibra basal que seria observada no gênero *Trichomonas* e não no gênero *Eutrichomastix*.

Não discutiremos aquí a validez do gênero *Eutrichomastix* KOFOID & SWEZY, 1915; assinalamos somente que frequentemente o flagelo marginal dos protozoários do gênero *Trichomonas* DONNÉ, 1836 pode apresentar-se destacado da membrana ondulante, em grande número de indivíduos nos esfregaços fixados e corados, permitindo a confusão com *Eutrichomastix*. O critério da presença da fibra basal nos *Trichomonas* e sua ausência nos *Eutrichomastix*, frizado por BISHOP (1939) servirá talvez para a diagnose diferencial de ambos os gêneros, desde que nos utilizemos de técnicas que permitam uma bôa coloração desse orgânulo e que se demonstre mais amplamente seu valor genérico. Porem quanto às espécies de *Eutrichomastix*, anteriormente descritas por vários autores, associadas a espécies de *Trichomonas*, em um mesmo hospedeiro, é dificil ou mesmo impossivel a aplicação desse critério, porque as descrições dos diferentes autores são geralmente omissas nesse ponto e suas figuras, pouco elucidativas nesse particular.

Pensamos que só uma revisão cuidadosa do material onde já foram assinaladas espécies de *Eutrichomastix* permitirá esclarecer o assunto definitivamente porque, segundo nossa experiência, poderíamos ter considerado como existentes tantas espécies desse gênero quantas são as de *Trichomonas* com que trabalhamos, si fôssemos interpretar levianamente todos os tricômonas que libertaram sua membrana ondulante, o que está claramente documentado em nosso trabalho de 1940, principalmente quando verificamos que tais formas predominam no início das culturas exuberantes, deixando de aparecer nas culturas já plenamente desenvolvidas. Parece-nos que este fato explica a observação de FONSECA (1940) sobre o seu *Eutrichomastix bertholdoi*, que só pôde ser visto em esfregaços, associado ao *Trichomonas tapiri* FONSECA, 1940, ao passo que nas culturas somente foram observadas as formas em tricômonas.

Ainda quanto à membrana ondulante, assinalamos que em algumas espécies, junto à fibra marginal há uma segunda fibra, denominada fibra marginal acessória, já representada por WESTPHALL (1935) em suas figuras números 1 e 3 de *Trichomonas vaginalis*, embora não referidas no texto; WENRICH (1935) assinala a existência dessa fibra marginal acessória em outras espécies de *Trichomonas*, como por exemplo em *T. augusta*, *T. muris*, etc.; STABLER (1937 e 1941) demonstrou sua existência em *Trichomonas gallinae* e SAMUELS (1941), em *Trichomonas augusta*. Este autor refere que

a natureza dupla da fibra marginal provavelmente levou muitos autores a considerá-la como divisão longitudinal da membrana, no início de um processo de multiplicação do flagelado (DOBELL, 1909; KOFOID & SWEZY, 1915).

AUTOTOMIA

Supostos processos de autotomia em tricômonas foram referidos principalmente por KOFOID & SWEZY (1915), em *Trichomonas augusta* ALEXEIEFF, 1911; por HINSHAW (1926), em *Trichomonas buccalis* (GOODEY) KOFOID; por WENRICH (1931), BLAND, GOLDSTEIN, WENRICH & WEINER (1932) e POWELL (1936), em *Trichomonas vaginalis* DONNÉ, 1836 e por STABLER (1941), em *Trichomonas gallinae* (RIVOLTA, 1878).

WENRICH (1939) cita os seguintes argumentos em favor da autotomia: 1) nas lâminas, são encontrados todos os graus de constrição do corpo dos tricômonas; 2) existem, nos preparados, porções de citoplasma já destacadas dos protozoários; 3) depois da perda de parte do citoplasma, os indivíduos tornam-se pequenos, com o axostilo longo e membrana ondulante alta; 4) indivíduos em autotomia podem ser observados vivos pelo exame a fresco.

Não só não pudemos confirmar a existência da autotomia, como ainda os fatos lembrados a favor deste fenômeno podem ter explicação diferente. Assim, os indivíduos mais ou menos estreitados na parte média do corpo, podem apresentar-se desse modo por defeito de fixação, pois esses protozoários são extremamente plásticos; as massas citoplásmicas isoladas, existentes nos preparados e que foram consideradas como porções de citoplasma separadas dos flagelados por autotomia, provavelmente são formas aflageladas imoveis ou talvez detritos, em outros casos; os indivíduos pequenos, de axostilo proeminente e membrana ondulante larga, admitidos como tendo perdido parte do corpo por autotomia, são, na realidade, formas senescentes de tricômonas, descritas anteriormente por nós em várias espécies de tricômonas *(T. vitali, T. muris, T. caviae e T. hominis)* e confirmadas por HOGUE (1943) em *Trichomonas vaginalis;* os indivíduos aparentemente em autotomia, observados pelo exame a fresco, podem ser explicados como sendo protozoários que apresentam fragmentos diversos aderentes ao corpo e ao axostilo, o que foi tambem verificado em *Trichomonas vaginalis* por HOGUE (1943).

Em resumo, o que os diferentes autores teem considerado como fases diversas de um processo de autotomia são, na realidade, indivíduos deformados pela fixação ou com grumos aderentes ao corpo e ao axostilo, formas aflageladas imoveis e formas senescentes.

CONGLOMERADOS, FORMAÇÕES EM ROSETA E SOMATELAS

O conceito de "somatela" foi creado por KOFOID & SWEZY (1915) para indicar massas citoplásmicas contendo vários núcleos e vários complexos flagelares; admitiam eles que tais formações fossem devidas a divisões múltiplas de um determinado exemplar.

Formações de somatelas teem sido assinaladas em diferentes espécies de tricômonas, como por exemplo em *Trichomonas augusta, Trichomonas muris,* etc. por KOFOID & SWEZY (1915), em *Trichomonas gallinae* por STABLER & SHELANSKI (1936) e STABLER (1941).

Outros autores referem-se ao encontro de numerosos tricômonas reunidos, dando-lhes o nome de "conglomerados" ou "formações em roseta". LYFORD (1941), que encontrou esses conglomerados e formações em roseta em culturas de *Trichomonas foetus* (RIEDMÜLLER), quando havia grande quantidade de soro no meio de cultura, sugere que tais formações sejam devidas a uma reação de aglutinação; entretanto, HOGUE (1943) verificou a existência de conglomerados de *Trichomonas vaginalis* quando mantidos em culturas de tecidos, onde havia apenas 5% de soro ou de plasma na solução de Ringer, admitindo por isso que tal fenômeno não seja devido ao teor em soro, do meio.

Esta autora encontrou os tricômonas sempre agrupados em torno de grânulos de plasma e acredita que para aí se dirigiram atraídos pelos alimentos, formando então os "conglomerados e formações em roseta", que teriam antes a significação de uma resposta quimiotática. Este ponto de vista concorda plenamente com nossas observações, pois os tricômonas frequentemente se apresentam presos a partículas do meio.

Outro mecanismo que concorre para a formação das "somatelas" é o muco, pois verificamos que esfregaços de tricômonas feitos em material obtido diretamente do hospedeiro apresentam frequentemente amontoados de protozoários e estes teem tambem os flagelos aderentes ao corpo; porem, se antes de fazermos o esfregaço, lavarmos o material em água com carbonato de sódio e depois contrifugarmos, então os tricômonas raramente se apresentam agrupados e os flagelos estão sempre separados do corpo e tambem entre si. STABLER (1941) verificou a existência de conglomerados de *Trichomonas gallinae* em torno de detritos amorfos e em torno de células epiteliais do hospedeiro, presos a esses detritos por meio de pendúnculos longos e finos (em outra parte deste trabalho já demonstramos que esses supostos pedúnculos são, na realidade, axostilos das formas senescentes).

Este autor considera as "somatelas" diferentes dos "conglomerados", porem julgamos que ambos sejam da mesma natureza; apenas, no caso dos chamados "conglomerados", a partícula em torno da

qual os tricômonas estão aderentes é bastante volumosa, ao passo que nas chamadas "somatelas", nada se nota de particular, permanecendo os flagelados aderentes uns aos outros pelo muco do hospedeiro, ou pelas substâncias adesivas existentes no meio de cultura.

FORMAS AMEBOIDES E "PSEUDOCISTOS"

Em trabalho anterior (1940) demonstramos que as formas ameboides denominadas por alguns autores de "pseudocistos", não estão absolutamente relacionadas com encistamento (fenômeno que não existe nos tricômonas), nem com degeneração, sendo de ordem completamente diversa. Tais formas ocorrem sempre que esses flagelados são colocados sob condições estimulantes de sua multiplicação, indicando um elevado grau de vitalidade. Estas observações foram plenamente confirmadas por HOGUE (1943), que verificou que as formas ameboides de *T. vaginalis* aparecem nas culturas de tecidos, logo após o explante, quando há alimentação abundante.

Fenomeno diverso, tambem observado no genero *Trichomonas*, são as modificações agônicas, muitas vezes confundidas com as formas ameboides acima referidas. Estes flagelados, mantidos algum tempo entre lâmina e lamínula, diminuem seus movimentos, seus flagelos aderem à superfície do corpo e eles adquirem movimentos ameboides que pouco a pouco desaparecem, tornando-se os indivíduos arredondados e imoveis. Estas modificações agônicas teem sido verificadas em numerosas espécies de tricômonas por diversos autores, como por exemplo: BRAUN & SEIFERT (1915 e 1916), em *Trichomonas hominis;* DAVIS (1929) e BLAND, GOLDSTEIN & WENRICH (1931), em *T vaginalis;* SAMUELS (1941), em *T. augusta*, etc. Nós observamos esse fenômeno em todas as espécies com que trabalhamos.

ON SOME MORPHOLOGICAL PREJUDICES ON THE GENUS "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" AND THEIR TAXONOMIC SIGNIFICANCE

Abstract

This paper deals with some aspects of the general morphology of the species of the genus Trichomonas DONNÉ, *1836. The methods were the same used for the elaboration of a previous paper (1940) and the materials were trichomonad flagellates of man, sheep, guinea-pigs, fowl, pigeons, snakes, lizards, toads and frogs.*

The principal conclusions are sumarized below:

a) the rows of chromatic granules of the axostyle and costa as well as the chromatic granules scattered in the cytoplasm are artifacts developed by the technical procedures and are devoid of taxonomic significance;

b) the "protoplasmic stalk" is merely the axostyle of the senescent forms;

c) the trichomonads lack a true cytostome and cytopharynx, these denominations having been applied to a poorly stained para-blepharoplastic portion of the axostyle, which sometimes looks like a "mouth";

d) the apparently structural differences of the axostyle alluded to by some workers have no specific significance, being as said above, only artifacts;

e) the ondulating membrane may become free, thus invalidating most of the species of the genus Eutrichomastix KOFOID & SWEZY, *1915, when the latter happen to be in association with species of the genus Trichomonas;*

f) there is no evidence of the existence of autotomy; its supposed presence may signify only a bad position of the trichomonads under fixation, any particle attached to their bodies or to the axostyles, and even aflagellated or senescent forms;

g) conglomerates, rosette formations and somatellas are the results of chimiotactic responses of the flagellate to certain particles, occasionally with cooperation of mucilaginous substances from the medium;

h) the signification of the amoeboid forms and "pseudo-cysts" have been discussed in a previous paper (1940).

BIBLIOGRAFIA

ALEXEIEFF, A. — 1909 — Les flagellés parasites de l'intestin des batraciens indigènes. *C. R. Soc. Biol.*, 66: 199-201.

ALEXEIEFF, A. — 1911 — Sur la spécification dans le genre Trichomonas Donné. *C. R. Soc. Biol.*, 71: 539-541.

ALEXEIEFF, A. — 1914 — Notes Protistologiques. *Zool. Anz.*, 43: 515-524.

ALLEN, E. A. — 1936 — A Pentatrichomonas associated with certain cases of enterohepatitis or "blackhead" of poultry. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 55, (3): 315-322.

ALLEN, E. A. — 1940 — A redescription of Trichomonas gallinarum Martin and Robertson, 1911, from the chicken and turkey. *Proc. Helminthol. Soc. of Washington*, 7, (2): 65-67.

BISHOP, A. — 1931 — The morphology and method of division in Trichomonas. *Parasit.*, 23: 129-156.

BISHOP, A. — 1939 — A note upon the systematic position of "Trichomonas" keilini (Bishop, 1935). *Parasit.*, 31: 469-472.

BLAND, P. B., L. GOLDSTEIN, & D. H. WENRICH, — 1931 — Vaginal trichomoniasis in the pregnant woman: a clinical and morphologic study. *Jour. Am. Med. Ass.*, 96: 157-163.

BLAND, P. B., L. GOLDSTEIN, D. H. WENRICH, & E. WEINER, — 1932 — Studies on the biology of Trichomonas vaginalis. *Am. Jour. Hyg.*, 16: 492-512.

CHATTON, E. — 1920 — Culture indéfinie d'un Trichomonas intestinal du cobaye; essais de purification; action morphogène des milieux sur la membrane ondulante. *C. R. Soc. Biol.*, 83: 69-72.

CUNHA, A. M. & J. MUNIZ, — 1926 — Sur les flagellés parasites des oiseaux du Brésil. *C. R. Soc. Biol.*, 95: 1459-1460.

DAVAINE, C. — 1875 — Monadiens *in* Dict. Encycl. Sci. Med. (Dir.: A. Dechambre), série 2, tome 9, 115-130.

DAVIS, C. H. — 1929 — Trichomonas vaginalis Donné. Second report of experimental and clinical observations. *Am. Jour. Obst. and Gyn.*, 18: 575-580.

DOBELL, C. — 1909 — Researches on the intestinal Protozoa of frogs and toads. *Quart. Jour. Microsc. Sci.*, 53: 201-277.

DOGIEL, V. A. (*) — 1916 — On some parasitic Protozoa from the intestine of termites. I. Tetramitidae. *Russ. Jour. Zool.*, 1: 1-54, pls. I-IV.

DUJARDIN, F. (*) — 1841 — Hist. Nat. des Zoophites (Infusoires), in 8.º, atlas, Paris.

EHRENBERG, C. J. (*) — 1838 — Die Infusoinsthierchen, Leipzig.

FONSECA, F. DA — 1940 — Protozoários parasitas. *Mem. Inst. Butantan*, S. Paulo, 14: 43-52.

GRASSÉ, P. P. — 1926 — Contribution à l'étude des Flagellés parasites. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 65: 345-602.

GRASSI, B. (*) — 1879 — Dei protozoi parassiti e specialmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz. Med. Ital. Lombard.*, Milano, 34: 445.

GUPTA, B. M. DAS — 1936 — Observations on the flagellates of the genera Trichomonas and Trichomastix. *Parasit.*, 28: 195-201, pl. VII.

HEGNER, R. — 1938 — Big fleas have little fleas. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 285 pgs.

HEGNER, R. & H. RATCLIFFE, — 1927 — Trichomonads from the vagina of monkey, from the mouth of the cat and man, and from the intestine of the monkey, opossum and prairie-dog. *Jour. Parasit.*, 14: 27-35, pl. III.

HEGNER, R. & H. RATCLIFFE, — 1927 — Trichomonads from the mouth of the dog. *Jour. Parasit.*, 14: 51-53.

HEGNER, R. W. & W. H. TAGLIAFERRO — 1925 — Human Protozoology, The Macmillan Co., New York, XIX + 597 pp.

HINSHAW, H. C. (*) — 1926 — On the morphology and mitosis of Trichomonas buccalis (Goodey) Kofoid. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 29: 159-174.

HOGUE, M. J. — 1943 — The effect of Trichomonas vaginalis on tissue-culture cells. *Am. Jour. Hyg.*, 37, (2): 142-152.

KIRBY JR., H. — 1931 — Trichomonad Flagellates from termites. II. Eutrichomastix, and the subfamily Trichomonadinae. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 36, (10): 171-262, pls. XIV-XXII.

KOFOID, C. A. & O. SWEZY (*) — 1915 — Mitosis and multiple fission in trichomonad flagellates. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 51: 287-380, pls. I-VIII.

KUCZYNSKI, M. H. — 1914 — Untersuchungen an Trichomonaden. *Arch. Protistenk.*, 33: 119-204.

KÜNSTLER, J. (*) — 1884 — Trichomonas vaginalis. *Jour. Micrographie*, 8: 317-331.

LYFORD, H. S. — 1941 — Some reactions of a pathogenic flagellate, Trichomonas foetus, to environmental changes in bacteria-free cultures. *Am. Jour. Hyg.*, 33, (Sec. C): 69-87.

MARTIN, C. M. & M. ROBERTSON — 1911 — Further observations on the caecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates. *Quart. Jour. Microsc. Sci.*, 57 :58-81.

MINCHIN, E. A. — 1917 — An introduction to the study of the Protozoa, Ed. Arnold, London, XI + 517 pgs.

PARISI, B. — 1910 — Su alcuni flagellati endoparassiti. *Arch. Protistenk.*, 19: 232-238, pl. XIV.

PEREIRA, C. & W. F. DE ALMEIDA — 1940 — Sôbre a verdadeira natureza das "formas ameboides", dos pretensos "cistos" e "formas degenerativas" no gênero Trichomonas Donné, 1836. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 11: 347-366, est. LI-LVI.

PERRONCITO, E. — 1901 — I parassiti dell'uomo. Fr. Vallardi, Milano, 632 pgs, 20 est.

POWELL, W. N. — 1936 — Trichomonas vaginalis Donné, 1836; its morphologic caracteristics, mitosis and specific identity. *Am. Jour. Hyg.*, 24: 145-169.

SAMUELS, R. — 1941 — The morphology and division of Trichomonas augusta Alexeieff. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 60: (4), 421-440.

STABLER, R. M. — 1937 — Further studies on Trichomonas columbae. *Jour. Parasit.*, 23: 554.

STABLER, R. M. — 1941 — The morphology of Trichomonas gallinae (=columbae). *Jour. Morphol.*, 69, (3): 501-515, pls. I-III.

STABLER, R. M. & H. A. SHELANSKI — 1936 — Trichomonas columbae as a cause of death in the hawk. *Jour. Parasit.*, 22: 539-540.

TRAVIS, B. V. — 1932 — Trichomonas phasiani, a new flagellate from the ring-necked pheasant, Phasianus torquatus Gmelin. *Jour. Parasit.*, 18: 285-287, 1 pl.

VIDIGAL, D. — 1943 — Eutrichomastix Kofoid e Swezy 1915. Considerações em tôrno do gênero. Descrição do Eutrichomastix Vital-Brasili n. sp. (família Trichomonadidae). *Boletim de Indústria Animal*, Nova Série, S. Paulo, 6: 30-34.

WENRICH, D. H. — 1921 — The structure and division of Trichomonas muris (Hartmann). *Jour. Morphol.*, 36: 119-155.

WENRICH, D. H. — 1931 — Morphological studies on the Trichomonad Flagellates of man. *Arch. Soc. Biol. de Montevideo*, Suppl. pt. 5, 1185-1199.

WENRICH, D. H. — 1939 — The morphology of Trichomonas vaginalis. Vol. jubilare pro prof. Sadao Yoshida, vol. II. *The Osaka Nat. Hist. Soc.. The Inst. for Res. in Microbic Dis.*, Osaka, Imp. Univ., Japan, 65-80.

WENRICH, D. H. & M. A. EMMERSON — 1933 — Studies on the morphology of Tritrichomonas foetus (Riedmüller) from American cows. *Jour. Morphol.*, 55: 193-205.

WENYON, C. M. — 1915 — Observations on the common intestinal Protozoa of man; their diagnosis and pathogenicity. *The Lancet*, London, 2: 1173-1183.

WENYON, C. M. — 1926 — Protozoology. 2 vols. Baillière, Tindall and Cox, London, XVI + 1563 pgs.

———o———

(*) Não consultado o original.

Vol. 14 — Art. 12 Dezembro de 1943

UM MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA PARA O ESTUDO DA MORFOLOGIA INTERNA DE INVERTEBRADOS MICROSCÓPICOS EM TOTO-MONTAGEM

POR

C. Pereira e M. P. de Castro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 18-19

Nas tentativas de investigação da morfologia interna dos ácaros de interesse econômico da coorte *Diacotricha* de OUDEMANS, esbarramos num escôlho técnico aparentemente intransponivel, constituido pela imensa dificuldade que esses animálculos apresentam em se deixar corar com regularidade, em todas as variadas condições de experiência a que foram submetidos.

Na suposição de que seu revestimento cutâneo tivesse porosidade mais fina que o tamanho das moléculas ou micelas dos corantes básicos habituais, resolvemos apelar para as impregnações metálicas, cujos reativos possuem menor complexidade estrutural.

Para tanto, servimo-nos do complexo de carbonato de prata amoniacal de DEL RIO HORTEGA (1919), que para o fim em vista teve de ser diluido à metade, afim de ser possivel usar dele apenas uma gota para cerca de 10 cm^3 de água, ou seja, uma quantidade do complexo equivalente a cerca de 0,65 mg do nitrato de prata cristalizado que servira de ponto de partida para a obtenção do complexo amoniacal.

Verificamos que quaisquer das misturas fixadoras usuais, baseadas no emprego do formol, do ácido pícrico e do ácido acético, em meio aquoso ou alcoólico, podem facultar bôas impregnações metálicas, pelo que o processo de fixação deixa de apresentar interesse particular.

Para a obtenção de preparados de facil leitura, revelou-se interessante o tratamento prévio, a quente, do material, pelo carbonato de sódio a 2 por cento, como foi preconizado por PEREIRA (1940), pois além de desencrustar suas partes quitinosas menos transparentes, apresenta ainda a vantagem de dissociar do material partículas porventura a ele adherentes, sem interferir com a bôa conservação das partes moles, o que não só se revelou útil no estudo dos tiroglifídeos, como tambem no dos sarcoptídeos.

Outro pormenor importante consiste no tratamento do material com água amoniacal a 1 por cento, o que permite uma redução muito mais eletiva da prata sobre os diferentes órgãos do invertebrado, tornando mais esquemática e mais claramente interpretável sua organização interna.

Quanto à diluição do complexo de carbonato de prata amoniacal no momento de usá-lo, adotamos 1 gota para 10 cm³, por ser esta a capacidade média útil dos tubos de ensáio em que executávamos todas as manipulações do material, sendo a troca dos diferentes líquidos feita por meio de pipetas.

Para a obtenção de preparados devidamente limpos verificamos ser imprescindivel uma longa deshidratação do material no álcool absoluto, pois do contrário a nitidez das estruturas seria posteriormente prejudicada.

No que se refere à diafanização do material, fomos obrigados a abandonar o creosoto, que até então usávamos, para adotar o benzoato de metila, que tem a vantagem de não interferir nos resultados da impregnação metálica, ao passo que o primeiro tende a obscurecer demasiadamente as tonalidades da preparação, de modo a tornar mais difícil sua interpretação.

No concernente à montagem, utilizamos o bálsamo, sem dificuldades para os diferentes tipos de artrópodos com os quais trabalhamos, tais como ácaros, piolhos, malófagas, larvas de mosquitos, genitálias de borboletas, etc., ao passo que os nematoides exigiram a colodionização do material na lâmina ou na lamínula, como havia sido anteriormente preconizado por PEREIRA e VAZ (1934).

Indicamos a seguir os pormenores do nosso método de impregnação argêntica.

COMPLEXO DE CARBONATO DE PRATA AMONIACAL

Reativos:

50 cm³ de uma solução aquosa de nitrato de prata a 10 por cento;

300 cm³ de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 2,5 por cento;

amoníaco líquido de 0,925 = 22° Bé.

Técnica:

Coloca-se toda a solução de nitrato de prata em balão ou frasco de Erlenmeyer, de 500 cm³ de capacidade; em seguida, vai-se juntando a pouco e pouco toda a solução de carbonato de sódio, sob agitação constante da mistura, de modo a ser obtido um precipitado fino de car-

bonato de prata; terminada a operação, junta-se o amoníaco lentamente, gota a gota e sob agitação constante da mistura, na quantidade apenas suficiente para redissolver o carbonato de prata, com o maior cuidado para não exceder do estrictamente necessário, sendo mesmo prudente permitir que um ou outro grânulo de carbonato deixe de ser dissolvido. Não é aconselhavel filtrar a solução, devendo ela ser mantida e utilizada apenas com os cuidados usuais na técnica das impregnações metálicas.

MÉTODO DE IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA

Reativos :

Água da torneira.

Água bidistilada.

Solução aquosa de carbonato de sódio a 2 por cento.

Água amoniacal (solução aquosa de amoníaco líquido a 1 por cento).

O complexo de carbonato de prata amoniacal indicado acima.

Solução de formol neutro a 1 por cento.

Álcool absoluto.

Benzoato de metila.

Bálsamos do Canadá ou do Brasil.

a) — Método para os artrópodos e plathelmintos :

1. Lavar em água, para a remoção do fixador.
2. Tratar pelo carbonato de sódio aquecido a 60° C., durante 5 a 10 minutos.
3. Lavar rapidamente em água.
4. Tratar a frio pela água amoniacal, durante meia hora.
5. Lavar em água bidistilada durante meia hora, trocando o liquido por 3 vezes no decorrer da operação.
6. Impregnar pelo complexo de carbonato de prata amoniacal, na proporção de 1 gota para 10 cm^3 de água bidistilada, durante 30 minutos à temperatura de 60° C., ou por 12 horas à temperatura ambiente.
7. Lavar em água bidistilada, a frio, durante 30 minutos.
8. Reduzir a prata pelo formol neutro, durante 30 minutos.
9. Lavar em água bidistilada durante 5 minutos.
10. Deshidratar em álcool absoluto, durante 30 minutos à temperatura de 60° C., ou por 12 horas à temperatura ambiente, fazendo uma troca de líquido nos últimos 10 minutos.
11. Diafanizar pelo benzoato de metila e montar em bálsamo.

b) — Método para os nematoides :

1. a 10 (inclusive). Como no método anterior.

11. Colar o material sobre a lâmina ou a lamínula, por uma solução de celoidina a 1,5 por cento em álcool-éter, durante 1 minuto.

12. Deshidratar em álcool a 95 por cento, durante cerca de 3 minutos.

13. Diafanizar em benzoato de metila e montar em bálsamo do Canadá xaroposo ou em bálsamo do Brasil.

Resultados :

A impregnação pela prata, nas condições acima indicadas, comunica diferentes tons de castanho aos vários órgãos do invertebrado, permitindo reconhecer facilmente sua morfologia interna integral, inclusive o sistema nervoso. No concernente à morfologia externa, é precioso o reforço que a impregnação traz aos acidentes quitinosos mais delicados, facultando a anàlise minuciosa das particularidades mais discretas da sua estrutura, com a conservação perfeita dos seus valores relativos, de modo a permitir que o material se apresente com inteira naturalidade ao exame microscópico, mesmo empregando-se as objetivas de imersão homogênea.

A SILVER IMPREGNATION METHOD FOR THE TOTO-MOUNT STUDY OF THE INTERNAL MORPHOLOGY OF MICROSCOPICAL INVERTEBRATES

Abstract

Staining solution: Hortega's (1919) ammoniacal silver carbonate complex; make up the solution with bi-distilled water to twice its volume.

Method for the arthropods and plathelminths :

1. Remove the fixing fluid by washing in tap water.

2. Treat by a warm (60° C.) 2 per cent sodium carbonate solution, for 5 to 10 minutes.

3. Wash in tap water.

4) Treat by a 1 per cent ammoniacal solution, for 30 minutes.

5. Wash in bi-distilled water for 30 minutes, changing three times the water.

6. Impregnate in the warm (60° C.) silver solution (1 drop for 10 ml of bi-distilled water) for 30 minutes, or for 12 hours at room temperature.

7. Wash in bi-distilled water, for 30 minutes.

8. Reduce for 30 minutes in 1 per cent neutralised formalin.

9. Wash in bi-distilled water, for 5 minutes.

10. Dehydrate and wash in absolute alcohol for 30 minutes at 60° C. or 12 hours at room temperature, changing the alcohol in the last 10 minutes.

11. Clear in methyl benzoate and mount in balsam.

Method for nematodes :

1. to 10. — As above.

11. Attach the material to a cover-glass or to a slide by a 1.5 per cent celloidin solution, for 1 minute.

12. Dehydrate in 95 per cent alcohol, for 3 minutes.

13. Clear in methyl benzoate and mount in natural Canada balsam or Brazil balsam.

Results : internal organs brownish and well delineated; chitinous structures clearly defined.

BIBLIOGRAFIA

PEREIRA, C. — 1940 — Sôbre a diafanização dos artrópodos. *Rev. de Entomologia*, Rio de Janeiro, 11: 642-644.

PEREIRA, C. e Z. VAZ — 1934 — Toto-montagem de nematoides; nova e simples técnica para a montagem em bálsamo. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 5: 77-86.

RIO-HORTEGA, P. DEL — 1919 — *in* Langeron, M. — 1934 — Précis de Microscopie, 5.ª edição. Masson et Cie., Paris. 585 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 18

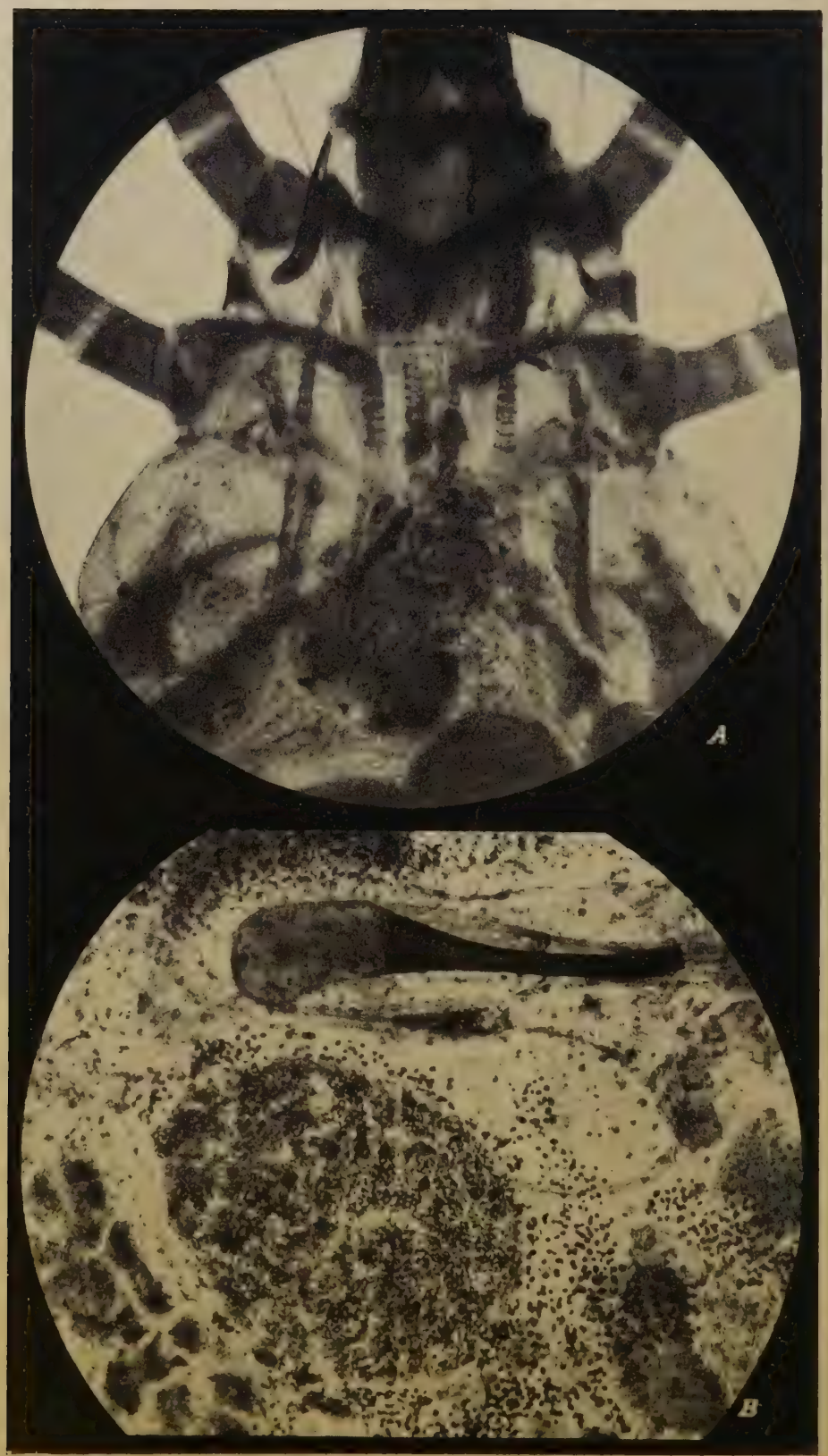
Fig. *A* — *Rhizoglyphus* sp. : total.
Fig. *B* — *Rhizoglyphus* sp. : complexo genital.

Estampa 19

Fig. *A* — *Rhizoglyphus* sp. : musculatura dorsal.
Fig. *B* — *Temnocephala* sp. : testículo e cirro.

(Federman e Mazza fot.)

A
B


A
B

Vol. 14 — Art. 13 Dezembro de 1943

"PEREIRAIA" N. G., PARA O "PHYSOCEPHALUS LASSANCEI TRAV., 1921" (NEMATODA: SPIRURIDAE), COM REDESCRIÇÃO DA ESPÉCIE - TIPO

POR

R. Cuocolo

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 7 figuras no texto

Physocephalus lassancei TRAV., 1921 foi o nome creado por TRAVASSOS (1921) para um espirurídeo do estômago de *Mazama simplicicornis* proveniente de Lassance, Minas Gerais. Revendo o material colhido em *Mazama simplicicornis*, depositado sob número 2.675 na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, gentilmente cedido pelo professor TRAVASSOS, a quem muito agradecemos, verificamos que *P. lassancei* afasta-se dos demais representantes do gênero por uma série de caracteres, que permitem a creação de gênero aparte para contê-la. Como entre os demais gêneros dos *Arduenninae* não encontramos outro com caracteres que permitam a inclusão desta espécie, resolvemos erigir novo gênero, ao qual denominamos *Pereiraia*, em homenagem ao nosso mestre o Prof. CLEMENTE PEREIRA.

Pereiraia n. g.

Arduenninae de porte médio. Boca com dois lábios laterais trilobados, providos de três papilas externas. Não apresentam dilatação na cutícula cervical. Um par de papilas cervicais simétricas e um só par de asas cuticulares cervicais. Vestíbulo cilíndrico, longo, formado por uma hélice quitinosa de passo curto. Esôfago longo e dividido em dois segmentos, um anterior mais curto e mais delgado e outro, posterior, mais longo e mais espesso. Cauda do macho enrolada ventralmente em espiral, com expansões cuticulares formando um par de asas caudais simétricas. Quatro pares de papilas précloacais pedunculadas; dois pares de papilas adcloacais também pedunculadas e quatro pares de papilas pequenas e sésseis no vértice da cauda. Gubernáculo presente. Espículos desiguais, um curto e grosso, outro longo e delgado. Fêmeas com vulva aberta na metade anterior do corpo muito próximo da linha equatorial. Ovos larvados no momento da postura. Parasitos de mamíferos.

Espécie-tipo : *Pereiraia lassancei* (TRAV., 1921) n. comb.

Diagnose diferencial: *Pereiraia* n. g., distingue-se facilmente dos demais gêneros da subfamília *Arduenninae* RAILLIET & HENRY, 1911, aproximando-se, contudo, de *Physocephalus* DIESING, 1861, do qual é afastado por uma série de caracteres, entre os quais assinalamos:

Physocephalus DIESING, 1861

1. Dilatação cuticular cervical presente.
2. Papilas cervicais nitidamente assimétricas, uma anterior e outra posterior ao ponto de início das asas cervicais.
3. Três pares de asas cuticulares cervicais, sendo: um par lateral, um subventral e um subdorsal.
4. Quatro pares de papilas pedunculadas préanais e quatro pares de pequenas papilas sésseis caudais. Ausência de papilas adanais.

Pereiraia n. g.

1. Dilatação cuticular cervical ausente.
2. Papilas cervicais simétricas, ambas colocadas anteriormente ao ponto de início das asas cervicais.
3. Apenas um par de asas cuticulares cervicais, com situação lateral.
4. Quatro pares de papilas pedunculadas préanais, quatro pares de papilas caudais pequenas e sesséis, dois pares de papilas adanais grandes e pedunculadas.

Pereiraia lassancei (TRAV., 1921) n. comb.

Sinonímia : *Physocephalus lassancei* TRAV., 1921.

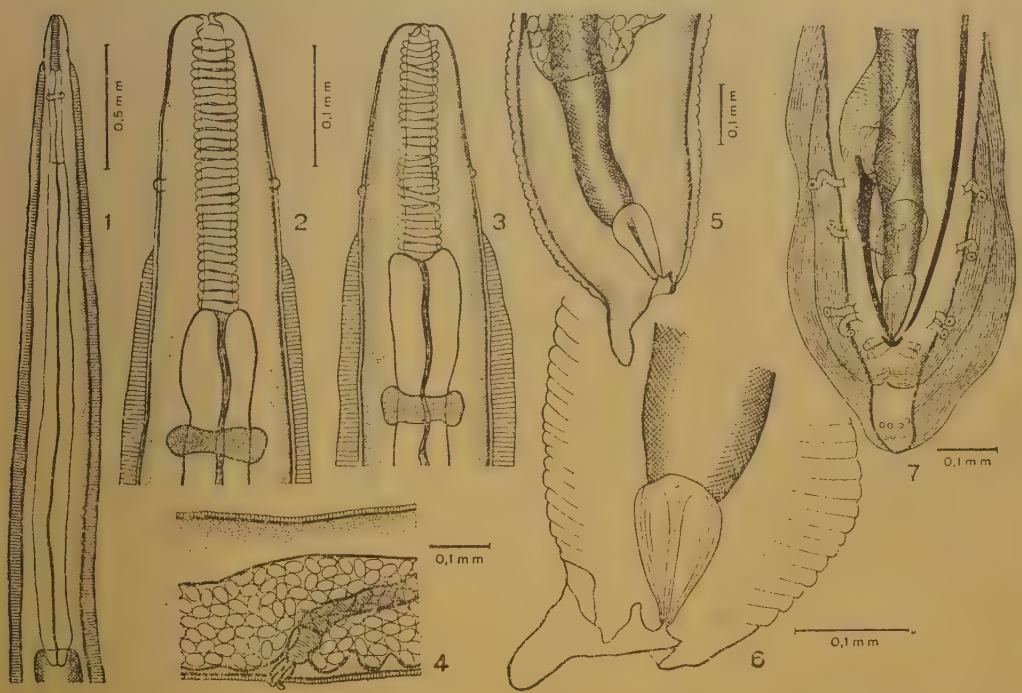
Arduenninae de porte médio, sendo os machos ligeiramente menores que as fêmeas. Corpo subcilíndrico com as extremidades afiladas, sendo a anterior mais fina que a posterior. Cutícula com estrias transversais nítidas. Não apresentam dilatação em correspondência com a cutícula cervical. À distância de 0,180 a 0,200 mm da extremidade anterior tem início o par de asas simples, que se apresenta como duas expansões cuticulares simétricas e finamente estriadas transversalmente. Papilas cervicais, em número de duas, simétricas, distando 0,130 — 0,140 mm da extremidade anterior.

Aparelho digestivo: — Boca — relativamente pequena, provida de um par de lábios laterais trilobados. Vestíbulo bucal — longo, de conformação aproximadamente cilíndrica, com parede quitinosa, constituida por uma hélice de passo curto que, vista de face, aparenta uma pilha de aneis quitinosos. Mede 0,180 — 0,200 mm de comprimento por 0,033 — 0,037 mm de diâmetro. Esôfago — muscular e relativamente longo, nitidamente dividido em dois segmentos, dos quais o posterior é muito mais longo e de maior calibre. A porção anterior do esôfago mede 0,330 — 0,425 mm de comprimento por 0,040 — 0,055 mm de diâmetro; a porção posterior mede 1,6 — 2,0 mm de comprimento por 0,10 — 0,14 mm de diâmetro. Intestino médio — longo, mediano, uniforme, de paredes delgadas, achatado no sentido ântero-posterior. Intestino terminal — curto, de paredes espessas, em forma de cone de ápice voltado para trás e ventralmente, medindo 0,10 — 0,15 mm de comprimento. Anus da fêmea e cloaca do macho — subterminais, ventrais.

Anel nervoso: — postfaringeano, envolvendo o esôfago na união do terço anterior com os dois terços posteriores da primeira porção, à distância de 0,30 a 0,32 mm da extremidade anterior.

A pequena diferença de porte entre machos e fêmeas torna as medidas comuns da mesma ordem de grandeza nos dois sexos.

Macho: — ligeiramente mais curto e mais delgado que a fêmea. Mede: 11,95 a 12,85 mm de comprimento por 0,27 a 0,30 mm de espessura. Cauda fortemente enrolada ventralmente em espiral. Asas cuticulares caudais largas e nitidamente estriadas longitudinalmente, com estriação transversal delicada. Apresenta dez pares de papilas posteriores, assim distribuidas: quatro pares de papilas pré-cloacais grandes e pedunculadas, dois pares de papilas adcloacais tam-



Pereiraia n. g.: Fig. 1 — Extremidade anterior. Fig. 2 — Vestíbulo bucal da fêmea. Fig. 3 — *Idem* do macho. Fig. 4 — Abertura vulvar. Fig. 5 — Cauda da fêmea, de perfil. Fig. 6 — *Idem*, de face. Fig. 7 — Cauda do macho, de frente.

bem pedunculadas e quatro pares de pequenas papilas sésseis no vértice da cauda. O tamanho das papilas pré-cloacais e o intervalo entre cada par decresce no sentido ântero-posterior. A distância entre os diferentes pares de papilas é a seguinte: 0,087 mm entre as do primeiro, segundo e terceiro pares, as do quarto par ficam juntas com as do terceiro par, e distam 0,20 — 0,21 mm da extremidade caudal. Testículo — tubular, longo e único. Espículos desiguais, um muito longo

e fino, medindo 1,185 — 1,192 mm de comprimento por 0,012 — 0,014 mm de espessura; outro curto e grosso, com 0,328 — 0,332 mm de comprimento por 0,021 — 0,025 mm de espessura. Gubernáculo — presente. Cauda — mede 0,189 — 0,200 mm de comprimento.

Fêmea: — ligeiramente mais longa e mais espessa que o macho. Mede: 13,45 — 16,65 mm de comprimento por 0,29 — 0,32 mm de maior espessura. Anus — ventral, subterminal. Cauda — cônica, medindo 0,160 — 0,165 mm de comprimento, provida de pequeno apêndice caudal, com area de 0,090 mm de extensão. Dois ovários tubuliformes, um anterior e outro posterior. Útero — longo e descrevendo numerosas alças. Ovejector — longo, tubuliforme, de paredes espessas, dirigido de trás para deante. Vulva abrindo-se ligeiramente adeante do meio do corpo. Ovos elipsoidais e larvados no momento da postura. Medem 0,037 mm de comprimento por 0,017 mm de largura.

Localização: — estômago.

Hospedeiro: — *Mazama simplicicornis.*

Procedência: — Lassance. Estado de Minas Gerais. Brasil.

"PEREIRAIA" N. G., FOR "PHYSOCEPHALUS LASSANCEI TRAV., 1921" (NEMATODA: SPIRURIDAE), WITH REDESCRIPTION OF TYPE-SPECIES

Abstract

Pereiraia n. g. is erected for Physocephalus lassancei TRAV., *1921, with the following differential diagnosis: close to Physocephalus Diesing, 1861 from which is distinguishable by: 1 — absence of cuticular swelling; 2 — symmetrical cervical papillae before the origin of cervical alae; 3 — but one pair of cervical cuticular alae, laterally placed; 4 — four pairs of pedunculated pre-anal papillae, four pairs of small caudal sessil papillae and two pairs of pedunculated ad-anal papillae.*

BIBLIOGRAFIA

CIUREA, J. — 1912 — Über Spiroptera sexalata Molin, aus dem Magen des Hausschweines. *Zool. Jahrb.*, 32: 285-294.

SCHULZ, R. E. — 1927 — Zur Kenntnis der Helminthenfauna der Nagetiere der Union S. S. R. II. Spirurata. *Trud Inst. Exper. Vet. Moscow*, 4 (2): 31-60.

TRAVASSOS, L. — 1921 — Nematodeos novos, I. *Brasil Médico*, 2 (24): 367-368.

TRAVASSOS, L. — 1928 — Note sur la sous-famille Arduenninae Railliet et Henry, 1911. *C. r. d. Sc. Soc. Biol.*, Paris, 99: 875.

Vol. 14 — Art. 14 Dezembro de 1943

TÉCNICA PARA O XENODIAGNÓSTICO DA HABRONEMOSE GÁSTRICA DOS EQUÍDEOS

POR

M. J. Mello e R. Cuocolo

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampa 20

Clinicamente, a habronemose gástrica dos equídeos é uma helmintose desprovida de interesse prático, pois os animais parasitados aparentemente nada sofrem, mesmo quando sujeitos a grandes infestações.

Três são as espécies do gênero *Habronema* DIESING, 1861 que parasitam o cavalo, localizando-se preferentemente no estômago. As espécies *H. muscae* (CARTER, 1861), e *H. microstoma* (SCHNEIDER, (1866) vivem sobre a mucosa do estômago, sem provocar maiores danos localmente, ao passo que *H. megastoma* (RUDOLPHI, 1819) acarreta o aparecimento de nódulos adenomatosos na mucosa gástrica. Entretanto, mesmo para esta última espécie, cujas lesões anátomo-patológicas aparentam relativa gravidade, a helmintose é apenas um achado de autópsia, porquanto além de não ser acompanhada de quadro sintomatológico particular, são improfícuas todas as tentativas no sentido de detectar os ovos dos helmintos ou seus embriões nas fezes dos animais parasitados.

Contudo, si a habronemose gástrica, consequente à localização do verme adulto no estômago não constitue uma entidade mórbida de interesse prático, passa a se revestir de grande importância quando considerada como foco disseminador das demais formas clínicas da helmintose, devidas aos estádios larvários dos helmintos; estes nematoides são heteroxenos, tendo como hospedeiros intermediários várias moscas cosmopolitas, cujas larvas se criam nas fezes dos equídeos.

As larvas das três espécies são capazes de acarretar no cavalo, quando localizadas erraticamente, três entidades mórbidas a saber : "esponja", peribronquite nodular e conjuntivite parasitária.

A "esponja", que recebeu uma série grande de nomes como "ferida de verão", "dermite granulosa", "esponja do Brasil", etc. vem a ser a lesão acarretada pela presença das larvas de *Habronema* na pele dos equídeos. Foi assinalada pela primeira vez por BOULEY (1850), havendo RIVOLTA (1884) verificado a sua natureza parasitária. A "esponja" aparece quando as larvas infestantes destes helmintos são libertadas por moscas parasitadas no ato de lamber ferimentos do cavalo.

A peribronquite nodular é consequente à localização das larvas dos helmintos no pulmão dos equídeos, onde dão lugar à formação de pequenos nódulos fibrinosos na luz dos bronquíolos centrais; de permeio a essa massa fibrinosa são encontradas as larvas de *Habronema*, e em pequena área em torno dos bronquíolos aparece uma zona de esclerose.

A conjuntivite parasitária se desenvolve quando as larvas infestantes são depositadas sobre as conjuntivas onde se introduzem e dão aparecimento a uma forma de conjuntivite granulosa.

Destas três localizações erráticas tem particular importância a chamada "esponja", pois é conhecida sua rebeldia ao tratamento. Além de antiestética, é uma lesão incômoda, acompanhada de prurido intenso e insuportavel, obrigando o animal a coçá-la com os dentes, o que a torna mais grave. É tambem séde de infecções secundárias frequentes, seguidas de consequências de maior ou menor monta e, quando totalmente curadas, deixam sequelas irreparaveis.

No combate à esponja prevalecem as medidas profiláticas sobre os meios terapêuticos, devendo a profilaxia ser baseada no ciclo evolutivo dos helmintos.

Para facilidade de exposição podemos dividir o dito ciclo em três fases, a saber:

1.º) fase adulta, em que os helmintos estão localizados de preferência no estômago do cavalo, local onde as fêmeas põem os ovos já embrionados.

2.º) fase em que os agentes de propagação são expelidos com as fezes para o meio ambiente.

3.º) fase larval no hospedeiro intermediário.

Por conseguinte, na profilaxia da esponja podemos interromper o ciclo do helminto em qualquer das três fases.

Sem dúvida, o meio mais eficiente e mais prático vem a ser o combate ao verme adulto, pela administração de antihelmínticos aos animais doentes, que desempenham o papel de focos de disseminação de todas as outras formas clínicas da helmintose.

Na curta fase de vida livre dos parasitos, isto é, quando se encontram nas dejecções do hospedeiro, as medidas profiláticas poderiam ser dirigidas quer no sentido de colocar tais fezes ao abrigo de moscas, quer pela sua desinfecção por meio de agentes químicos. A primeira medida exige dispositivos especiais, dispendiosos, e até certo ponto de emprego muito limitado. O tratamento químico das fezes, si bem que constitua medida eficiente quando bem praticada, pois exercerá ação não só sobre as larvas dos helmintos como sobre as dos insetos vectores, não deixa de ser precária, não só por ser muito dis-

pendiosa e requerer cuidados especiais, como por ser aplicavel apenas aos animais estabulados.

A ruptura do ciclo evolutivo dos helmintos na fase de larva infestante consiste no combate aos seus hospedeiros intermediários, as moscas, sendo por conseguinte tambem medida de dificil aplicação e muitas vezes de custo dispendioso.

Resta, portanto, a primeira hipótese, ou seja, a profilaxia por meio do tratamento da habronemose gástrica. Esta medida, entretanto, era de dificil aplicação, pois esbarrava na impossibilidade prática do diagnóstico da helmintose pelos processos rotineiros de laboratório.

Os tratados de helmintologia dão como meio de diagnóstico o exame simples das fezes suspeitas, com o escôpo de despistar a infestação do equídeo. Todavia, em nossos 138 casos de habronemose gástrica, positivados pelo xenodiagnóstico, nem uma só vez tivemos oportunidade de descobrir nas fezes os agentes de propagação de tais helmintos, quer pelo exame simples das fezes entre lâmina e lamínula, quer através dos diversos processos de enriquecimento, possivelmente devido não só às suas dimensões como à extrema fragilidade de que são dotados.

A esse respeito, fazemos nossas as palavras de DESCAZEAUX & MOREL (1933) : "alguns autores pretendem que o exame microscópico das fezes permite encontrar os ovos; provavelmente eles nunca praticaram esse exame".

Neste sentido será conveniente assinalar ainda a possibilidade de engano que poderá ocorrer com um examinador menos avisado. Frequentemente surgem nas fezes de cavalo larvas rabditiformes que poderiam ser tomadas por larvas de *Habronema*. Assim, RANSOM (1913) referiu uma larva rabditiforme encontrada em larva de mosca obtida em cultura de fezes de cavalo, supondo tratar-se de *Habronema*. Aliás, o próprio autor chamou a atenção para o perigo de confusão que podem trazer as larvas rabditoides de vida livre relativamente frequentes na terra ou nas fezes de cavalo.

Entre as tentativas anteriores para contornar as dificuldades do diagnóstico coprológico da habronemose gástrica, temos as de HODKINGS (1921) *in* DESCASEUX e MOREL (1933) que preconisou o emprego da lavagem do estômago e posterior exame do liquido de lavagem obtido por sifonagem. Como se depreende desde logo, o método desse autor, além de não eliminar as dificuldades inherentes ao exame coprológico, tem o grave inconveniente de exigir um técnico treinado na execução de operação tão trabalhosa como é a tubagem do estômago.

Baseados no ciclo evolutivo do helminto, DESCAZEAUX & MOREL (1933) idealizaram pela primeira vez o xenodiagnóstico para a habronemose gástrica. Além de a técnica destes autores comportar certo número de detalhes perfeitamente dispensáveis, eles restringiram o seu emprego ao período de 15 de junho a 15 de setembro, o que talvez tenha cooperado para a não divulgação do método. Em resumo sua técnica consiste no seguinte : as fezes a examinar são colocadas em um grande cristalizador e diluidas em duas vezes o seu volume de água. Faz-se a mistura passar através um tamis de malhas bem finas, afim de privá-lo das partículas mais grosseiras, após o que o líquido é distribuido em dois ou três recipientes com a capacidade de dois litros cada um. Deixa-se o material decantar, elimina-se o sobrenadante por sifonagem, reune-se o sedimento dos vários recipientes em um único, que ocupa o volume aproximado de três quartos de litro. Em seguida, para evitar que o substracto fique demasiadamente úmido, adiciona-se certa quantidade de fezes do mesmo cavalo, sem nenhum tratamento prévio. Ao material assim preparado juntam-se ovos de postura recente de moscas, com o cuidado de lavá-los previamente em água morna. A pesquisa das larvas dos helmintos pode ser feita posteriormente nas larvas, pupas e moscas adultas.

Com o fim de simplificar o exame, tornando-o de mais facil execução, elaboramos a técnica seguinte:

TÉCNICA

Em recipientes metálicos cilíndricos, de 8 cm de altura e 5 cm de diâmetro, tendo as paredes internas parafinadas (para evitar oxidação e consequente desgaste rápido do material) colocamos as fezes a examinar até dois terços da altura do cilindro.

Sobre as fezes suspeitas depositam-se cerca de vinte ovos de mosca colhidos em esterqueira comum, tendo o cuidado prévio de limpá-los sumariamente com pincel mole.

Para conservar o ambiente úmido, em boas condições para o desenvolvimento das moscas, coloca-se uma camada de cerca de 2 cm de altura de algodão hidrófilo na parte superior da preparação, a qual deverá ser diariamente umidecida. Este procedimento evita o encharcamento das fezes com água, o que até certo ponto dificultaria o desenvolvimento do inseto. O algodão deverá ser colocado de maneira a deixar folgas laterais que permitam a saída facil do inseto para a porção superior do recipiente.

Para evitar que o algodão adira às fezes, dificultando a operação diária de umidecimento, podemos dispor entre a camada de fezes e a de algodão um disco de papel de filtro de diâmetro inferior ao do ci-

lindro metálico, de tal forma que deixe folga lateral suficiente para passagem do inseto.

Assim preparado, o recipiente é fechado com tampas metálicas especiais, com a forma de funil invertido. A boca do funil deve adaptar-se perfeitamente à do recipiente e suas paredes são providas de pequenos orifícios, insuficientes para escape das moscas mas suficientes para arejar o meio de cultura, propiciando melhores condições para o desenvolvimento do inseto. À haste do funil adapta-se por meio de uma rolha de cortiça, um pequeno tubo de vidro.

Finalmente o recipiente é rotulado e numerado, tanto na porção metálica inferior como no tubo de vidro ajustado à haste do funil, o que facilitará as operações ulteriores, particularmente quando se procede a exames em série.

Com o fito de abreviar o tempo de evolução do inseto, tornando assim o exame mais expedito e evitando possiveis alterações para o lado das fezes a examinar, os dispositivos devidamente preparados são colocados em ambiente quente (37-39° C) e ventilado.

Após um período de 7-8 dias, sob essas condições, aparecem as moscas adultas, que procuram abandonar o recipiente escuro inferior dirigindo-se normalmente para o tubo de vidro superior; como a haste do funil penetra na luz do tubo de vidro até uma altura adequada, o retorno das moscas para o ambiente de cultura se torna suficientemente dificultado para não prejudicar a colheita dos insetos a examinar.

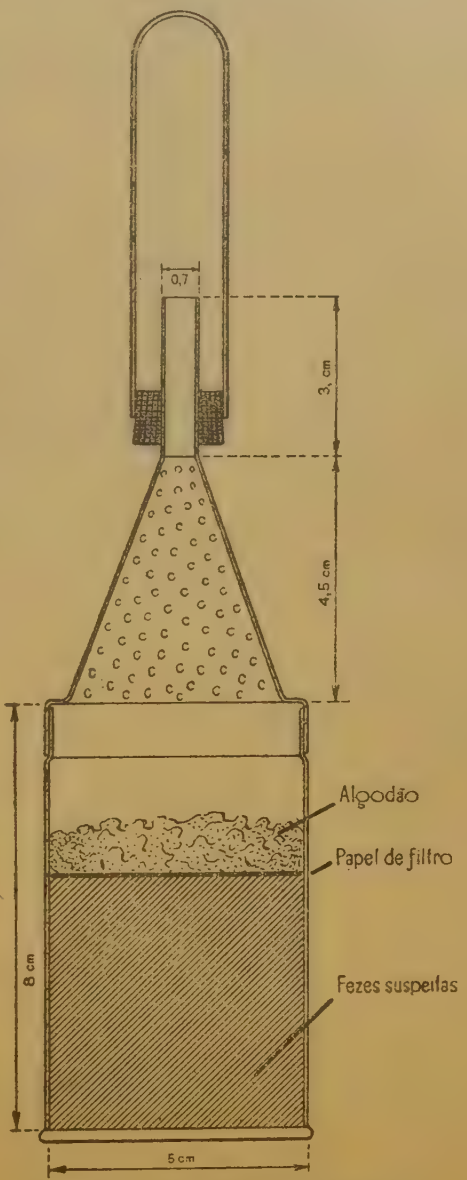


Fig. 1 — Dispositivo para o xenodiagnóstico

Por ocasião do exame das moscas, os tubos de vidro são retirados, o orifício da haste do funil é obturado com uma rolha de cortiça

para evitar a fuga de outras moscas que porventura se encontrem ainda na câmara inferior, ao passo que o tubo com as moscas é embuchado com algodão embebido em éter.

Uma vez anestesiadas, as moscas são retiradas do tubo e dissecadas em solução fisiológica, ao microscópio, com pequeno aumento. No caso do exame ser positivo encontrar-se-ão nas moscas examinadas as larvas infestantes de *Habronema* localizadas principalmente na cabeça do inseto.

Poderiamos ainda proceder ao exame das moscas segundo a técnica de de M. TORRES (1925), pondo as moscas obtidas na cultura em contato com uma pequena placa de Petri, contendo sôro normal de cavalo. As moscas, ao lamber o sôro, poriam em liberdade pela tromba as larvas infestantes dos helmintos, que seriam posteriormente pesquisadas no sôro contido na placa. Entretanto, essa técnica tomaria mais tempo e exigiria mais material que a simples dissecção das moscas.

A diagnose é facil, pois as larvas são de dimensões relativamente grandes e providas, na extremidade posterior, de uma extrutura peculiar, constituida por uma pequena dilatação esferoidal crivada de pequenos espinhos.

O número de larvas infestantes encontrado em cada inseto é variavel, mas geralmente grande, tendo sido possivel encontrar no decorrer de nossas observações uma mosca que abrigava 60 larvas infestantes apenas na cabeça.

Do exame de uma série de 138 equídeos portadores de habronemose gástrica, pudemos concluir que bastaria o exame de um inseto obtido em cultura sobre fezes para firmar o diagnóstico, pois todos os insetos obtidos em cultura sobre as fezes desses animais abrigavam larvas infestantes do helminto. Tivemos ainda oportunidade de repetir várias vezes o xenodiagnóstico em um grande número desses animais sempre com os mesmos resultados. Por outro lado os insetos obtidos em cultura de fezes de 63 equídeos não portadores de habronemose gástrica apresentaram-se sempre não infestados, o que foi confirmado em diversos exames feitos na maioria desses animais.

O exame poderá ser abreviado pela pesquisa das larvas dos helmintos nas larvas e pupas do inseto. As larvas de moscas a examinar devem ser as do segundo para o terceiro dia em diante, pois é somente no segundo dia do estádio larvário que as larvas de moscas se infestam com os embriões de *Habronema*, ou seja 3 a 4 dias após o preparo do material para exame, nas condições de umidade e temperatura acima referidas. A transformação em pupas geralmente se dá pelo sexto dia, prazo em que elas tambem poderão ser examinadas.

O exame das larvas e pupas é mais dificil. A pesquisa nestes dois estádios do inseto poderá ser feita por meio da dissecção cuidadosa ao microscópio ou por meio de cortes seriados corados pela hematoxilina-eosina. Nestes, as larvas dos helmintos são vistas no interior das células grânulo-gordurosas *(H. muscae)*, onde acarretam necrose, o que permite logo ao pequeno aumento divisar as células parasitadas, que se apresentam como massas eosinófilas mais ou menos homogêneas, ao passo que as células normais teem extrutura granulosa bastante típica.

Entretanto é preferivel proceder-se ao exame com os insetos adultos, pois aí as larvas são obtidas por simples dissecção e, além do maior porte, são dotadas de morfologia bastante peculiar.

Às vezes podem surgir na solução fisiológica que se emprega para a dissecção das moscas, pequenas larvas de nematoides que poderiam acarretar certas dúvidas; entretanto, estas são facilmente distinguiveis das larvas de *Habronema* pelos fatos seguintes:

1.º) localização : as larvas de *Habronema* não são encontradas no tubo gastro-intestinal do inseto, nem aderentes à sua superfície externa como acontece com as larvas rabditoides. Estas larvas são frequentes na terra e nas fezes de cavalo e, nas culturas de moscas, costumam aparecer aderentes ao corpo do inseto ou passam como comensais pelo intestino, acarretadas com o alimento.

2.º) Tamanho: é consideravelmente maior nas larvas de *Habronema* ao passo que as larvas dos nematoides de vida livre são de porte relativamente diminuto.

3.º) Morfologia : as larvas de vida livre são rabditiformes, ao passo que as de *Habronema* não o são, e teem ainda uma pequena dilatação esferoidal na cauda, provida de pequenos espinhos.

Evidentemente o novo método é de facil execução e apresenta, quando bem praticado, eficiência de 100 %.

Apresenta uma série de vantagens sobre a técnica original idealizada por DESCAZEAUX & MOREL (1933). Assim, em primeiro lugar, dispensa a operação preliminar de diluir e filtrar as fezes a examinar. Em segundo lugar, elimina o emprego de grandes recipientes preconizados por esses autores. O pequeno dispositivo metálico por nós imaginado torna facil a captura das moscas a examinar, que espontaneamente sobem para o pequeno tudo de vidro colocado na parte superior, procurando abandonar o ambiente escuro da câmara de cultura.

O material de exame assim simplificado torna possivel a execução de exame no campo, onde o material poderá ser devidamente preparado e enviado ao laboratório, aguardando-se o aparecimento das moscas adultas para o necessário exame.

Nas condições em que trabalhamos, o xenodiagnóstico pôde ser feito no decorrer de todo o ano; entretanto, nas regiões em que o inverno é rigoroso, o menor poder nutritivo que as fezes de cavalo apresentam durante esse período do ano, poderá ser corrigido seja pela adição de levedo, segundo GLASER (1927), seja pela mistura com fezes de porco como o fez HOCKENYOS (1931). Dos 201 animais examinados tivemos oportunidade de diagnosticar a habronemose gástrica em 138. O xenodiagnóstico repetido várias vezes em diferentes épocas do ano em muitos desses animais forneceu sempre os mesmos resultados, no decurso de dois anos consecutivos.

DESCAZEAUX & MOREL (1933) são de opinião que a restrição do período de exame coincida com a época de postura das fêmeas de *Habronema*, lembrando que é tambem justamente nessa época que são mais frequentes os casos de habronemose cutânea. Entretanto, a ocorrência mais frequente da "esponja" na estação quente parece estar ligada mais diretamente aos insetos vectores, mais abundantes no verão.

Para dar uma ligeira ideia da importância do xenodiagnóstico na profilaxia das diversas formas clínicas da habronemose lembramos que no período de 1938 a 1942 foram executados 1.233 exames de fezes de equídeos, não se tendo uma só vez diagnosticado essa helmintose. Nos anos de 1942 e 1943 foram executados, em nosso laboratório, 201 xenodiagnósticos, dos quais 138 foram positivos para a habronemose gástrica (68,65 %).

Abaixo damos uma tabela que resume os dados de nossos exames :

Procedência	Animal	Positivo	Negativo	Total
4.º Esquadrão de Cavalaria (S. Paulo)	Cavalo	46	52	98
Fazenda Sta. Alice (Terra Roxa) . .	Cavalo Burro	32 51	11 —	94
Particular (Sertãosinho)	Cavalo	1	—	1
Instituto Biológico (São Paulo) . . .	Cavalo	8	—	8
TOTAL		138	63	201

TECHNIC FOR THE XENODIAGNOSIS OF THE GASTRIC EQUINE HABRONEMOSIS

Abstract

After a discussion of the problem, the following technic is described for performing the xenodiagnosis: metallic cylindrical tins, 8 cm height x 5 cm diameter with a thin layer of paraffin inside, are partially filled (2/3 height) with the suspected horse feces, plus some twenty clean eggs of the house-fly; a disc of filter paper is applied to the material and covered with moist cotton; a perforated funnel-like metallic cover is applied by its larger opening to the tin, its apex being covered with a glass tube firmly attached to a perforated cork.

At 37-39° C, the adult flies emerge in 7-8 days and climb to the trasparent glass; this is removed, a cotton plug moistened with ether immobilizes the flies, which are then dissected under a low power microscope for the detection of the Habronema infective larvae.

BIBLIOGRAFIA

BOULEY, H. — 1850 — D'une variété particulaire d'inflamation de la peau. *Rec. de med. vét. prat.*, 7: 945-966.

BULL, L. B. — 1919 — A contribution to the study of habronemosis; a clinical, pathological and experimental investigation of a granul-condition of the Horse. *Trans. Roy. Soc. South Australia*, 43: 85-141.

DESCAZEAUX, M. J. — 1915 — Contribution à l'étude de l'"esponja" ou plaies d'été des equidés du Brasil. *Rec. Med. Vét. Prat.*, 91 (19/20): 468-486.

DESCAZEAUX, M. J. — 1936 — Las llagas de verano. *El Caballo*, Buenos Aires, 3 (11): 33-47.

DESCAZEAUX & MOREL — 1933 — Diagnostic biologique (xénodiagnostic) des Habronémoses gastriques du cheval. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 26 (8): 1010-1014.

DIEULOUARD — 1929 — Habronemose pulmonaire des Equidés. *Rec. Med. Vét. Prat.*, 105 (4): 206-212.

GLASER, R. W. — 1927 — Note on the continuous breeding of Musca domestica. *Jour. of Econ. Entomol.*, 20: 432-433.

HILL, G. F. — 1918 — Relationship of insects to parasitic diseases in Stock. Part 1: the life-history of Habronema muscae, H. microstoma e H. megastoma. *Proc. Roy. Soc. Victoria*, 31 (N. series): 11-76.

HOCKENYOS, G. L. — 1931 — Rearing houseflies for testing contact insecticides. *Jour. of Econ. Entomol.*, 24: 717-725.

JOHNSTON, T. H. & M. J. BANCROFT — 1920 — The life-history of Habronema in relation to Musca domestica and native flies in Queensland. *Proc. Roy. Soc. Queensland*, Brisbane, 32 (5): 61-68.

NEVEU-LEMAIRE, M. — 1936 — Traité d'helminthologie medicale et vétérinaire. Vigot Frères, Éditeurs, Paris, 1205-1215.

RANSOM, B. H. — 1911 — The life history of a parasitic nematode — Habronema muscae. *Science*, N. Y., 34: 690-692.

RANSOM, B. H. — 1913 — The life history of Habronema muscae (Carter), a parasite of the horse transmitted by the house fly. *U. S. Depart. of Agric. Bur. of. An. Ind.*, Bulletin 163, 36 pp.

RIVOLTA, S. — 1884 — La natura parassitica delle piaghe estive e gli effetti morbosi di una specie di Filaria que si puó denominare Dermofilaria irritans. *Giorn. di Anat., Fisiol. e Patol. d. Animali*, Pisa, 16: 128.

ROUBAUD, E. & J. DESCAZEAUX — 1921 — Contribution à l'histoire de la mouche domestique comme agent vecteur des habronémoses d'equidés. Cycle évolutif et parasitisme de l'Habronema megastoma (Rudolphi, 1819) chez la mouche. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 14 (8): 471-506.

ROUBAUD, E. & J. DESCAZEAUX — 1922 — Deuxième contribution à l'étude des mouches dans leurs rapports avec l'evolution des Habronèmes d'equidés. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 15 (10): 978-1001.

TORRES, C. M. — 1925 — L'hematotropisme des larves mûres d'Habronema muscae (Carter, 1861). *C. r. Soc. Biol.*, 93 (20): 38.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 20

Fig. *A* — Larva infestante de *Habronema muscae* (CARTER, 1861) obtida da cabeça de uma mosca cultivada em fezes de cavalo com habronemose gástrica.

Fig. *B* — Larvas de *Habronema muscae* (CARTER, 1861) abandonando a tromba de uma mosca obtida em cultura de fezes de cavalo parasitado pelo adulto do helminto.

Fig. *C* — Cauda de larva infestante de *Habronema muscae* (CARTER, 1861) com o botão espinhoso terminal.

A

B

C

Vol. 14 — Art. 15 Dezembro de 1943

ALGUNS ASPETOS DAS RELAÇÕES DO "HABRONEMA MUSCAE (CARTER, 1861)" COM A MOSCA DOMÉSTICA

POR

M. J. Mello e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com a estampa 21

O ciclo evolutivo do *Habronema muscae* (CARTER, 1861), bem como das outras espécies do gênero, que parasitam o cavalo, tem merecido estudo acurado por parte de diversos autores (CARTER, 1861; RANSOM, 1911, 1913; HILL, 1918; JOHNSTON & BANCROFT, 1920; ROUBAUD & DESCAZEAUX, 1921, 1922; CRAWFORD, 1926 e outros), achando-se em linhas gerais razoavelmente estabelecido.

O primeiro autor a fazer referências a êsse helminto foi CARTER (1861) que, encontrando as larvas infestantes na mosca doméstica, julgou tratar-se de um nematoide adulto, bissexuado, parasita exclusivo do inseto. Somente em 1911 RANSOM identificou o parasito de CARTER como a fase larvária de um helminto que parasita o estômago do cavalo — *Habronema muscae* (CARTER, 1861).

No presente trabalho procuramos abordar alguns pontos relativos ao ciclo evolutivo dêsse helminto e cujo conhecimento tenha importância prática, tanto para o diagnóstico biológico da verminose, como para o esclarecimento do mecanismo da formação da "esponja" em condições naturais.

As questões que nos propusemos resolver foram as seguintes:

1.º) Susceptibilidade dos ovos de moscas à infestação. Este é um ponto de particular importância quando o problema é encarado do ponto de vista do xenodiagnóstico. Si os embriões do helminto fossem capazes de penetrar ativamente pela casca do ovo da mosca, a técnica do xenodiagnóstico tornar-se-ia mais complexa, pois, dada a possibilidade deles já se encontrarem previamente infestados, não seria possivel usar para tal fim desovas de moscas apanhadas em esterqueira comum; em tal caso seria indispensavel empregar ovos obtidos em substracto seguramente não infestante.

2.º) Época em que as larvas de moscas começam a ser susceptiveis à infestação. Tambem é um dado que poderá ser aproveitado na prática do xenodiagnóstico, pois para abreviar o exame poderíamos recorrer ao emprego de larvas criadas até certa idade em substracto

não infestante, como fezes de porco, por exemplo, as quais seriam então colocadas sobre as fezes suspeitas.

3.°) Época em que as larvas de moscas deixam de ser susceptíveis à infestação. O conhecimento deste dado evitaria que na prática se utilizassem larvas incapazes de se infestar, o que redundaria em inexatidão de diagnóstico.

4.°) Duração da capacidade infestante das fezes de cavalo para as larvas de moscas. E', este, sem dúvida, outro dado de interesse prático no xenodiagnóstico, pois permite avaliar quantos dias poderão decorrer entre a eliminação das fezes e o exame do material.

5.°) Comportamento das larvas do *Habronema muscae* na mosca. É uma questão importante, ligada não só à técnica do xenodiagnóstico como ao mecanismo de formação da "esponja".

MATERIAL E MÉTODOS

Nossa fonte de material foi um cavalo infestado com *H. muscae* diagnosticada por meio do xenodiagnóstico, e cujas fezes constituiam o material infestante para as moscas; a criação de moscas não infestadas era feita em fezes de porco; as culturas de moscas feitas nestes dois meios de cultura eram mantidas em ambiente ventilado, à temperatura de cerca de 37 — 39° C e umidecidas diariamente.

EXPERIÊNCIAS

1.ª série : Susceptibilidade dos ovos de moscas à infestação.

Em um grande cristalizador contendo fezes de cavalo portador de habronemose gástrica foi colocada uma desova recente de *Musca domestica*. Após um período de vinte quatro horas, metade dos ovos foram transferidos para outro cristalizador contendo fezes recentes de porco, e a outra metade deixada no primeiro cristalizador para controle posterior.

Depois de sete a oito dias, surgiam as moscas adultas em ambos os cristalizadores.

O exame dos insetos adultos demonstrou uma infestação de 100 % nos exemplares provenientes do cristalizador com fezes de cavalo parasitado, ao passo que todas as moscas obtidas dos ovos transferidos para as fezes de porco foram negativas para as larvas de *Habronema*.

Uma série grande de experiências orientadas no mesmo sentido apresentaram sempre resultados absolutamente concordantes, o que permite concluir seguramente que os ovos de moscas não se infestam com os embriões de *Habronema*.

2.ª série : Época em que as larvas de moscas começam a ser susceptíveis à infestação.

Em um grande cristalizador com fezes do cavalo parasitado pelo *H. muscae* foram depositados ovos recentes de mosca doméstica.

Cerca de vinte e quatro horas depois tinha início o aparecimento das larvas. Logo após o seu aparecimento, algumas larvas eram imediatamente transferidas para um novo cristalizador, contendo fezes de porco. Doze horas depois novo lote de larvas era transferido para outro cristalizador com fezes recentes de porco. Depois de novo período de doze horas outro lote de larvas sofria o mesmo tratamento e, finalmente, cada vinte e quatro horas novo lote de larvas era separado e transferido para fezes recentes de porco.

Os insetos adultos obtidos de cada lote transferido para as fezes de porco eram examinados separadamente, tendo-se verificado que os insetos provenientes dos lotes isolados das fezes de cavalo até 24 horas depois de sua eclosão não se achavam parasitados, ao passo que os dos demais lotes apresentavam infestação de 100 %.

Dos resultados de várias experiências semelhantes pudemos concluir que a larva da mosca começa a se infestar somente 24 horas depois de sua eclosão.

Este fato vem confirmar que a infestação se dá atravez o tubo gastro-intestinal da larva do inseto, isto é, passivamente, por ingestão. Nas primeiras 24 horas a larva da mosca permanece quasi totalmente imovel, não procura alimento e consome apenas as reservas nutritivas trazidas do ovo. Si a infestação do inseto se processasse ativamente, atravez do tegumento da larva, parece-nos que tal fenômeno deveria ser possivel em qualquer época do estádio larvário, principalmente nas primeiras 24 horas de vida, em que a larva é lenta e estaria mais exposta ao ataque dos embriões do helminto.

3.ª série : Época em que as larvas de moscas deixam de ser susceptíveis à infestação.

Em um cristalizador grande foi colocada uma desova recente de mosca doméstica sobre fezes de porco, cujas larvas só começaram a ser colhidas no mínimo 24 horas depois da eclosão, em virtude dos resultados obtidos na experiência anterior. Finda a experiência as larvas que restavam nas fezes de porco serviam como testemunha de que as fezes de porco não eram infestantes.

De 24 em 24 horas um lote de larvas de moscas das fezes de porco era transferido para um novo cristalizador, contendo fezes frescas do cavalo infestado, retirando-se destas sempre uma porção, na qual se cultivava, a parte, um pequeno lote de ovos de moscas, que forneciam posteriormente informações sobre a capacidade infestante do material. Tais operações foram repetidas até o sétimo dia, havendo o exame das

moscas adultas obtidas nos diferentes lotes dado os resultados que se encontram representados na tabela abaixo.

TABELA 1

Resultados da 3.ª série de experiências

Moscas de larvas transferidas para as fezes do cavalo parasitado, a partir do	Moscas cultivadas sempre nas fezes do cavalo parasitado	Moscas cultivadas sempre em fezes de porco
2.º dia de vida: + +	+ +	—
3.º dia de vida: + +	+ +	—
4.º dia de vida: +	+ +	—
5.º dia de vida: —	+ +	—
6.º dia de vida: —	+ +	—
7.º dia de vida: —	+ +	—
8.º dia de vida: —	+ +	—

Com + + representamos os adultos do inseto muito infestados; com + os que exibiam pequeno número de larvas e com — os que não estavam parasitados pelas larvas infestantes do helminto.

Na primeira coluna estão representados os resultados do exame das moscas provenientes de larvas que permaneceram respectivamente de 1 a 7 dias em fezes de porco e depois foram transferidas para fezes do cavalo parasitado, até completar a evolução.

A segunda coluna representa os resultados de exame dos adultos provenientes de larvas cultivadas exclusivamente em fezes do cavalo parasitado, para controle do poder infestante dessas fezes.

Na terceira coluna estão registrados os resultados de exame de moscas cultivadas exclusivamente em fezes de porco para controlar a incapacidade infestante destas fezes.

Os resultados obtidos permitem concluir que as larvas de moscas se infestam principalmente no segundo dia após o nascimento, quando é maior a sua atividade. As larvas de três dias ainda são capazes de se infestar, mas com intensidade mais discreta que as das anteriores.

Nas condições em que trabalhamos, o inseto começa ordinariamente a pupar no quarto dia, embora somente consigam infestar-se as larvas que são transferidas das fezes de porco para as de cavalo parasitado até o terceiro dia de estádio larvário. As larvas do quarto dia já não se infestam, pois nessa época a larva do inseto já entra em repouso, não mais se alimentando até entrar na fase de pupa.

Algumas larvas só conseguem atingir a fase pupal no 5.º, 6.º e até 7.º dia, mas tambem essas não conseguem infestar-se senão no 2.º e 3.º dias, pois os insetos provenientes de lotes de larvas transferidos para as fezes de cavalo parasitado, no 5.º, 6.º e 7.º dia do estádio larvário, não apresentam larvas infestantes do *H. muscae*.

4.ª série : Duração da capacidade infestante das fezes de cavalo para as larvas de moscas.

Em um grande cristalizador eram depositadas fezes do cavalo parasitado. Diariamente transferia-se uma amostra dessas fezes para um recipiente pequeno e sobre ela colocavam-se algumas larvas de mosca doméstica de 24 horas, cultivadas até então em fezes de porco. Esta operação foi repetida durante quinze dias consecutivos.

Como, à medida que envelhecem, as fezes se vão tornando muito secas e constituem um mau substracto para o desenvolvimento do inseto, à amostra de fezes de cavalo parasitado juntava-se mais um terço de fezes de porco.

Os insetos adultos de todos os lotes eram examinados logo após o seu aparecimento, tendo-se verificado que somente até o nono dia são encontradas larvas infestantes nas moscas, o que permite fixar este prazo máximo para a capacidade infestante das fezes de cavalo.

5.ª série : Comportamento das larvas de *Habronema muscae* na mosca.

Em um grande recipiente contendo fezes do cavalo parasitado por *H. muscae* eram depositados ovos de mosca. Examinaram-se sucessivamente as larvas, pupas e adultos do inseto.

As larvas foram examinadas em cortes seriados e corados pela hematoxilina-eosina. Somente as larvas do segundo dia em diante se apresentaram parasitadas. Logo após a infestação o embrião do helminto atinge as células grânulo-gordurosas do inseto, nas quais acarreta necrose, o que permite reconhecê-las logo, pois perdem o aspeto granuloso e se transformam em massas regularmente homogêneas e eosinófilas, tendo no interior, próximo ao núcleo, o embriãosinho do verme.

O helminto prossegue sua evolução no interior das ditas células até a fase adulta do inseto, consumindo o conteudo celular de tal modo que, no adulto, as células grânulo-gordurosas ficam reduzidas apenas à sua membrana, simulando um verdadeiro cisto.

As pupas foram cuidadosamente dissecadas, exibindo sempre o helminto no interior das células grânulo-gordurosas.

Os adultos foram divididos em lotes, que eram examinados com intervalos de 24 horas. De cada inseto a examinar separavam-se os três segmentos (cabeça, torax e abdome) os quais eram dissecados em solução fisiológica, ao microscópio, com pequeno aumento.

Verificou-se que no primeiro dia as larvas são mais abundantes no abdome, encontrando-se mesmo, nas primeiras horas, muitas larvas no interior dos pseudo-cistos constituidos a custa das células grânulo-adiposas do inseto. No interior destes "cistos" as larvas são dota-

das de grande mobilidade, rompendo-os logo e dirigindo-se em seguida para a cabeça. No torax, as larvas infestantes são encontradas sempre em pequeno número, pois constitue apenas um segmento de passagem para as larvas que se encaminham do abdome para a cabeça. No segundo dia ainda são encontradas larvas infestantes no abdome e no torax do inseto, mas seu número é consideravelmente superior na cabeça. No terceiro dia praticamente já não se encontram larvas infestantes no abdome e no torax, sendo raras as moscas que apresentam uma ou outra nesses segmentos. Do quarto dia em diante não mais se encontram larvas no torax e abdome, ficando então todas localizadas na cabeça da mosca.

TABELA 2

Resultados da 5.ª série de experiências

Moscas examinadas		Larvas de *Habronema*			
Idade em dias	Número examinado	N.º total	No abdome	No torax	Na cabeça
1	21	284	168 (59,2%)	22 (7.7%)	94 (33.1%)
2	24	269	41 (15,2%)	11 (4,1%)	217 (80,7%)
3	28	332	6 (1,8%)	3 (0,9%)	323 (97,3%)
4	15	145	—	—	145 (100 %)
5	21	236	—	—	236 (100 %)
6	13	141	—	—	141 (100 %)
7	16	154	—	—	154 (100 %)

SOME ASPECTS OF THE RELATIONS BETWEEN "*HABRONEMA MUSCAE* (CARTER, 1861)" AND THE HOUSE-FLY

Abstract

This paper deals with some aspects of the relations between the house-fly and Habronema muscae (CARTER, *1861) in the manure of horses, chiefly from the viewpoint of xenodiagnosis; the main conclusions are the following :*

a) at the stage of eggs, the house-fly is not infected;

b) in the first 24 hours, the maggots also are not infected;

c) the main infection of the maggots is at the second day of life;

d) at the third day the maggots are almost not infected;

e) the manure of horses are infective for the housefly for nine days;

f) in the maggots, the larvae of the helminth are found in the cytoplasm of the fatty-body cells, which undergoe necrosis;

g) in the pupae, the parasitized cells are destroyed, remaining only a cyst-like wall embodying the Habronema larva.

h) in the adult fly, the infective larvae leave the cystic wall; in the first day they are almost exclusively located in the abdomen; in the second and third day they are distributed mainly in the head, but also in the thorax and abdomen; from the fourth to the following days the infective larvae are all assembled in the head of the fly.

BIBLIOGRAFIA

CARTER, H. J. (*) — 1861 — On a bisexual nematoid worm which infests the common house-fly (Musca domestica) in Bombay. *Tr. Med. Phys. Soc.* Bombay. n. s., 6: 12-16.

CARTER, H. J. — 1861 — On a bisexual nematoid worm which infests the common house-fly (Musca domestica) in Bombay. *Ann. Mag. Nat. Hist.* London. 7 (37): 29-33.

GRAWFORD, M. — 1926 — Development of Habronema larvae in drosophilid flies. *Journ. Comp. Path. Therap.*, 39 (4): 321-323.

GENERALI, G. (*) — 1886 — Una larva di nematode della mosca comune. *Atti Soc. d. Nat. Modena Rend.*, 2: 88-89.

HILL, G. F. — 1918 — Relationship of insects to parasitic diseases in Stock. Part 1: The life-history of Habronema muscae, H. microstoma and H. megastoma. *Proc. Roy. Soc. Victoria*, 31 (n. s.): 11-76.

JOHNSTON, T. H. & M. J. BANCROFT — 1920 — The life-history of Habronema in relation to Musca domestica and native flies in Queesland. *Proc. Roy. Soc. Queesland*, Brisbane. 32: (5): 61-88.

LEIDY, J. — 1874 — On a parasitic worm of the house-fly. *Proc. Acad. Nat. Soc. Philad.*, 26 (2): 139-140.

LINGARD, A. — 1915 — Observations on the filariae embryos found in the general circulation of the Equidae and Bovidae ond their probables pathological significance. *London Ref. Rev. Gen.*, 8: 179.

RANSOM, B. H. — 1911 — The life history of a parasitic nematode. Habronema muscae. *Science*, N. Y. 34: 690-692.

RANSOM, B. H. — 1913 — The life history of Habronema muscae (Carter), a parasite of the horse transmitted by the house-fly. *U. S. Depart. of Agric. Bur. of An. Ind.*, Bulletin 163; 36 pp.

ROUBAUD, E. & J. DESCAZEAUX — 1921 — Contribution à l'histoire de la mouche domestique comme agent vecteur des habronemoses d'equidés. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 14: 471-506.

ROUBAUD, E. & J. DESCAZEAUX — 1922 — Evolution de l'Habronema muscae chez la mouche domestique et de l'H. microstoma (Schn.) chez le stomoxe. *Bull. Pathol. Exot.*, 15 (7): 572-574.

(*) Não consultado o original.

ROUBAUD, E. & J. DESCAZEAUX — 1922 — Deuxième contribution à l'etude des mouches, dans leurs rapports avec l'evolution des Habronemes d'Equidés. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 5 (10): 978-1001.

TORRES, M., O. FONSECA & A. LEÃO — 1923 — Sur la "esponja" (Habronemose cutanée des equidés). Du parasitisme des mouches par l'Habronema muscae (Carter). *C. r. Soc. Biol.*, 89, 767.

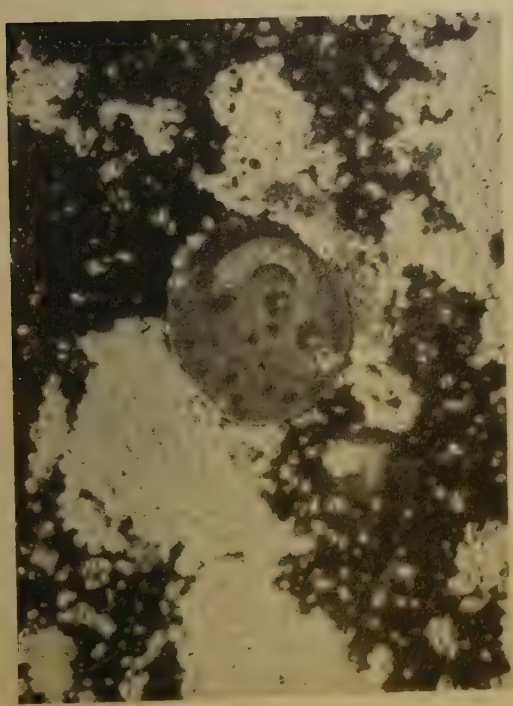
EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 21

Fig. *A* — Larva de *Habronema muscae* (CARTER 1861) no interior de uma célula grânulo adiposa de larva de *Musca domestica* cultivada em fezes de cavalo portador de habronemose gástrica.

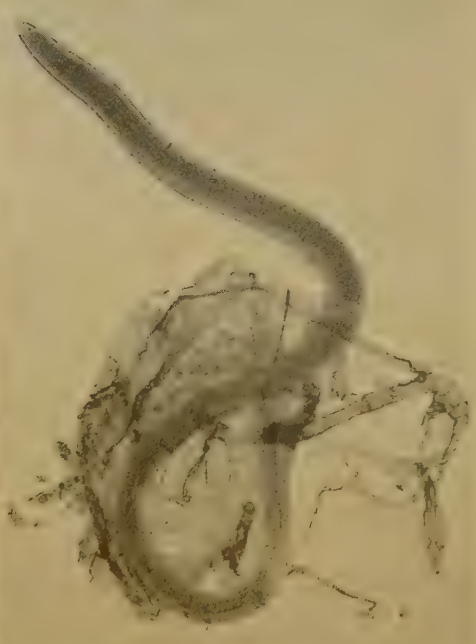
Fig. *B* — *Idem* na pupa.

Fig. *C* — Larva de *Habronema muscae* (CARTER, 1861) abandonando o pseudocisto formado à custa de célula grânulo-gordurosa do abdome de mosca recentemente emergida.

A



B



C

Vol. 14 — Art. 16 Dezembro de 1943

OBSERVAÇÕES SOBRE O ABÔRTO CONTAGIOSO DAS EGUAS EM S. PAULO

POR

M. D'Apice

Do Instituto Biológico de S. Paulo

O abôrto contagioso das eguas, bem conhecido na Europa, América e em outros países do mundo, parece não ter sido, tanto quanto nos consta a respeito, devidamente estudado entre nós, razão pela qual não conheciamos de modo preciso sua verdadeira natureza, embora a ocorrência de fócos isolados fossem observados aqui e acolá com relativa frequência.

Nêste trabalho, estudando um fóco de abôrto, isolamos a *Salmonella abortus equi*, obtendo ao mesmo tempo resultados favoráveis por meio da vacinação e das medidas sanitárias.

* * *

KILBORNE 1893 (14) e SMITH 1893 (20), foram os primeiros a estabelecer a natureza do abôrto das eguas, isolando um agente que consideraram semelhante ao bacilo do *Hog-cholera*.

DE JONG 1912 (3), na Holanda, isola o mesmo germem, seguindo-se-lhe os importantes trabalhos de GOOD and CORBETT 1913 (8) e GOOD and SMITH 1914 (9), que estudam a doença detalhadamente, precisando melhor a natureza do germem, classificando-o no grupo *enteritidis cholera suis*, e denominando-o *Salmonella abortivo equinus*. Conseguem êstes autores reproduzir a doença mediante a inoculação de culturas por via endovenosa, verificando ainda a importância dêsse germem na etiologia da poliartrite dos potros. SCHOFIELD 1914 (22) confirma essa verificação. A natureza paratífica é estudada particularmente por VAN HEELSBERGEN 1914 (11), MIESSNER e BERGE 1917 (16) na Alemanha; MURRAY 1919 (17), KELSER 1921 (13), e outros, na América; MIWO, citado por KASAI etc., 1916 (12), WATANABE 1937 (24) e FUJIMURA 1938 (7), no Japão; SAXER 1938 (21), na Suissa; PANISSET e VERGE 1927 (18) e VERGE 1938 (23), na França; RIGLOS e JURADO 1940 (19), na Argentina, e mais um avultado número de trabalhos à respeito, alguns interessantissimos.

Si a natureza etiológica não sofreu nenhuma contestação, a interpretação sôrológica, ao contrário, deu lugar a numerosas opiniões, destacando-se a de MURRAY, que acreditava que os animais sãos mostravam um título máximo até 1:40; SAXER 1938, admite até 1:100

como negativo, embora em casos positivos obtenha títulos até 1:400.000. DE JONG 1912, GOOD and CORBETT 1913, VAN HEELSBERGEN 1914, VERGE 1938, e outros, estabeleceram que os animais normais poderiam apresentar até um título de 1:200 ou 1:300; KELSER 1921 considera 1:500 como negativo, enquanto LÜTJE, citado por BONGERT (2), admite como título mínimo positivo 1:800 e entre 1/400 e 1/800 como suspeito.

Nós, no presente trabalho, admitimos um título mínimo de 1:300 como negativo, até 1:500 como suspeito, e acima dêste, como positivo.

Devemos, enfim, citar os trabalhos de DIMOCK e GOOD 1927 (4), DIMOCK e EDWARDS 1936 (5) e DIMOCK 1943 (6), que comentaram as várias causas do abôrto equino, frizando particularmente os caractéres diferenciais.

O combate à doença, uma vez que a observação mostrara que a infecção conferia certa resistência, abriu perspectivas para se organizar a profilaxia pela vacinação. Nêste particular, as opiniões são concordes, variando apenas no que se refere ao preparo da vacina e número de doses.

KELSER 1921, realizando a vacinação em larga escala com bacterina fenicada a 0,5%, obtem resultados favoráveis aplicando 6 doses. Num trabalho posterior, KOON e KELSER 1923 (15), reduzem para 4 o número de doses, com resultados igualmente satisfatórios.

GOOD e DIMOCK 1927 (10), com bacterina fenicada a 0,5%, obtêm bons resultados, aplicando 3 doses com intervalo de 1 semana entre uma e outra injeção.

FUJIMURA 1938 no Japão, usando vacina formolada em numero de 6 a 7 doses, consegue diminuir consideravelmente o número de abôrtos.

VERGE 1938 na França, prepara vacina formolada a 4 por mil, aplicando apenas 2 doses.

A vacinação produz reações locais ou gerais, mas nunca chega a comprometer a saúde do animal ou da cria.

Ao lado da imunização é aconselhável a aplicação de medidas sanitárias.

Cabe enfim assinalar, embora de passagem, que o abôrto das eguas, além da *Salmonella* poderá ser provocado por outras causas como : *Estreptococcus;* deficiencias alimentares e minerais; infecções diversas; acidentes, etc. Quanto a possibilidade de reconhecer como agente etiologico um virus filtravel, embora admitido por varios autores, quer-nos parecer que ainda não está suficientemente demonstrado.

À *Salmonella abortus equi*, cabe entretanto, sem duvida alguma, o papel mais importante, pois sua maior frequencia é atestada por numerosas estatísticas.

Entre muitos, VERGE 1938, em 1472 casos de abôrtos em eguas, estudados bacteriológicamente, verifica a seguinte frequência :

Salmonella abortus equi	41,7%	— *B. pyosepticum equi*	0,95%
Estreptococcus . . .	7,0%	— *Estaphilococcus* . .	0,24%
E. coli	3,6%	— Estereis	48,3%

*

* *

Em meados de 1941, numa importante criação de cavalos puro-sangue, localizada no interior do Estado, irrompe um surto de abôrto que, por incidir em animais muito finos, causou, em face do vultoso prejuizo que se esboçava, dado o caráter contagioso, justificavel alarme do proprietário, que solicitou, por isso, a intervenção do Instituto. Imediatamente recomendamos a observação de rigorosas medidas sanitárias afim de evitar a disseminação da doença, ao mesmo tempo que tentavamos obter material para exame. Não conseguindo obtê-lo no momento, solicitamos a remessa de sôro das eguas que haviam abortado, afim de procedermos à prova de aglutinação, que nos asseguraria, provavelmente, a possível natureza da doença.

A prova de aglutinação realizada nas condições habituais, com antígeno representado por uma amostra de *Salmonella abortus equi* da coleção do Instituto R. Koch, de Berlim, deu o seguinte resultado:

QUADRO 1

Prova de aglutinação com sôros de eguas que abortaram (1)

Eguas	Abôrto em	Título aglutinante
I(2)	10-3-41	1/400
II	25-2-41	1/800
III	27-2-41	1/800
IV	26-2-41	1/800
V	8-2-41	1/1.600
VI	5-2-41	1/3.200
VII	10-2-41	1/3.200

(1) Esta prova foi realizada em 13-3-41.
(2) O título aglutinante baixo mostrado pelo sôro dêste animal é provavelmente devido ao curto lapso de tempo decorrido entre o abôrto e a colheita de sangue.

A prova sôrológica, por si só já bastante significativa, valia por um diagnóstico da infecção paratífica; entretanto, a verificação

bacteriológica nos forneceria a prova definitiva. Por isso, tornamos a insistir na remessa de material para exame, em Bedson (3) (água e glicerina em partes iguais e fosfatada para um P^H 7,2). Dias depois recebemos 2 frascos contendo fragmentos de placenta de 2 eguas que haviam abortado, material que foi semeado em placas de agar sangue e Teague. A incubação de 24 horas a 37°C evidenciou o desenvolvimento, no meio seletivo de Teague, de colônias roseas, suspeitas de *Salmonella*. O exame dessas placas, após permanência em temperatura ambiente durante alguns dias, mostrou a formação, em torno das colônias, do anel mucoso característico. As placas de agar sangue mostraram o desenvolvimento de um único tipo de colônias, que nas provas realizadas nos permitiram classificar como *Salmonella abortus equi*.

PROVA SOROLÓGICA — Primeiramente fizemos a prova de aglutinação em lamina com os sôros padrões do Instituto R. Koch. segundo a técnica descrita por BOECKER e KAUFFMANN (1) obtendo os seguintes resultados:

Aglutinação em lamina da amostra isolada com os sôros a 1/50

Abortus equi	+	*London*	—
Newport	+	*Suispestifer*	—

Deante dêsse resultado, pode-se admitir que a amostra isolada não deve possuir fase não específica.

Não dispondo de sôros suficientes, decidimos, a partir do sôro *abortus equi* do Instituto R. Koch, diluido a 1/100, saturá-lo com a amostra isolada, submetendo-a a seguir à prova de aglutinação em tubo, juntamente com o sôro não absorvido, usando como antigenos a amostra isolada e a *Salmonella abortus equi* do Instituto R. Koch.

O quadro 2 resume os resultados dessa prova.

QUADRO 2

Prova de aglutinação com sôro *abortus equi* saturado e não saturado

Sôros	Amostra	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	Test.
Abortus equi	*S. abortus equi*	++	++	++	++	++	++	++	—
Abortus equi	Isolada	++	++	++	++	++	++	++	
Saturado . .	*S. abortus equi*	—	—	—	—	—	—	—	—
Saturado . .	Isolada	—	—	—	—	—	—	—	

Por essa prova, pode-se admitir que a amostra isolada contém pelo menos os fatores *e, n, x,* indicando que se trata, com toda a probabilidade, de *Salmonella abortus equi*.

(3) Em experiências preliminares haviamos verificado a grande resistência da *Salmonella* neste líquido conservador. Aliás, o material enviado nessas condições e mantido em temperatura ambiente permitiu o reisolamento do germem até pelo menos 4 meses após a recepção.

Características do germem isolado — Pequeno bastonete, um tanto polimorfo, Gram negativo, movel em culturas novas, não esporulado e não capsulado.

Caldo simples — Turvação uniforme, formando-se depósito no fundo do tubo após alguns dias.

Agar sangue — Colônias redondas ligeiramente convexas, lisas, esbranquiçadas, de 1 a 3 milímetros de diâmetro, de consistência mucosa e emulsionando-se facilmente. Após alguns dias de permanência em temperatura ambiente, forma-se em torno das colônias o anel mucoso, parcial ou completo, espesso, viscoso e elevado.

Teague — Colônias de morfologia idênticas às anteriores, porém de coloração rosea. Aqui também se nota a formação do anel mucoso.

Propriedades bioquimicas — Glicose + com gás; sacarose —; lactose —; manita +; xilose +; arabinose +; dulcita +; maltose +; dextrina —; salicina —; inosita —; hidrogênio sulfurado fraco (meio de Tilley); indol —; gelatina —; Stern —; Rhamnose Bitter —; D. Tartarato —; leite tornasolado: acidez inicial, tornando-se a seguir permanentemente alcalino.

Patogênico aos camondongos por via oral.

*
* *

O combate à doença se realizou em 2 sentidos: medidas profiláticas e vacinação.

Medidas profiláticas — Consistiram essencialmente em: a) separação dos animais que abortaram, dos sãos, procedendo-se a rigorosa desinfecção dos locais mediante lavagem e caiação com água de cal contendo 2 a 3 % de soda caustica; b) as eguas prenhes, um pouco antes da cria, eram separadas em maternidade, onde, no caso de abôrto, se procederia à destruição do féto, secundinas, palha da cama, etc., pelo fogo, e a seguir, à rigorosa desinfecção do local, mantendo-se ao mesmo tempo a egua separada enquanto perdurasse o corrimento uterino; c) em certos casos foi recomendado lavagem com solução de permanganato de potassio a 2 por mil; d) os garanhões que haviam coberto eguas que abortaram, deviam servir apenas o lote de eguas infectadas; e) contrôle rigoroso da água de bebida, forragem, objetos de uso, etc. susceptiveis de, uma vez contaminados, veícularem o agente da infecção.

Vacinação — A imunização por meio de vacinas mortas é discutida por vários autores, destacando-se KELSER, VERGE, FUJIMURA e outros, cada um dos quais usou um tipo de vacina, com aplicação, em ocasiões adequadas, de um número variável de injeções, afim de assegurar a imunidade. Nós, embora usando uma vacina morta, procuramos obter a imunidade reduzindo o número de doses, o que aliás conseguimos com sucesso.

A principio, tentamos a imunização com nossa vacina estoque, que nada mais era do que uma anacultura de *Salmonella abortus equi*. Entretanto a reação provocada em seguida à injeção (talvez devida à peptona do caldo) era tão alarmante que nos obrigou a modificar a técnica de preparo. Passamos então a preparar uma vacina autogena, nas seguintes condições: semeadura, de uma suspensão de germens obtidos em tubos de agar inclinado, em garrafas de Roux com agar simples, P^H 7,0. Após 48 horas de incubação a 37°C, o induto bacteriano mais ou menos exhuberante era lavado com um pouco de água fisiológica, obtendo-se assim uma espessa emulsão microbiana, que a seguir era morta à temperatura de 60°C durante uma hora. Comprovada a esterilidade em caldo e agar simples inclinado, preparavamos então diluições com água fisiológica fenicada a 0,5 % correspondente ao tubo n.° 3 do nephelometro de McFarland. Controlada a esterilidade nas condições habituais e a inocuidade pela inoculação, na dose de 5 cc. por via subcutânea, em cavalo, era então distribuida em empolas de 5 cc.

A imunização foi obtida mediante a aplicação de 3 doses de 5 cc com intervalo de uma semana entre uma e outra injeção da referida vacina, por via muscular, em eguas no 3.° mês de prenhez. Em seguida a estas vacinações não observamos reação local ou geral apreciavel.

QUADRO 3

Quadro demonstrando a incidência do abôrto contagioso, antes e depois da aplicação das medidas sanitárias e vacinação

Ano	Número de abôrtos	Total de eguas	Percentagem
1939	6	80	7,5%
1940	4	85	4,7%
1941	15	65	23,0%
1942	2	63	3,2%
1943	0 até Outubro	61	0

Cabe entretanto assinalar que a natureza dos 2 abôrtos ocorridos em 1942 não pôde ser precisada, embora um dêles, pelo menos, decorra do fáto de ser duplo. Como quer que seja, os resultados práticos obtidos, pelas medidas sanitárias e vacinação, repetidas anualmente, permitiram-nos controlar com sucesso a doença.

CONCLUSÕES

1) — O abôrto contagioso, das eguas em uma criação de cavalos puro-sangue, foi provocado pela *Salmonella abortus equi*.

2) — As medidas sanitárias e a vacinação com bacterina fenicada a 0,5% com 3 doses de 5 cc por via muscular, a partir do 3.º mês de prenhez e repetida anualmente, permitiram-nos controlar com sucesso o abôrto contagioso das eguas.

Consignamos nossos agradecimentos aos Drs. A. M. Penha, Paulo Nobrega e E. S. Martinelli, pela colaboração prestada.

INVESTIGATIONS ON EQUINE ABORTION IN S. PAULO

Abstract

In a outbreak of infectious abortion in mares, Salmonella abortus equi has been readily obtained from the fetal membranes. Sanitary measures and vaccination with a phenolated suspension of the etiological microorganism (3 doses of 5 cc by the intramuscular route following the 3rd month of pregnancy) lead to a definite control of the disease.

BIBLIOGRAFIA

1 — Boecker, E. und F. Kauffmann — 1931 — Bakteriologische Diagnostik. Julius Springer. Berlin. 105-114.

2 — Bongert, J. — 1927 — Bakteriologische Diagnostik der Tierseuchen. Richard Schoetz. Berlin. 533 pp.

3 — De Jong, D. A. — 1912 — Über einen Bacillus der Paratyphus B Enteriditis-Gruppe als Ursache eines seuchenhaften Abortus der Stute. *Z. f. Bakt.*, Orig., 67: 148-151.

4 — Dimock, W. W. and E. S. Good — 1927 — The diagnosis and differencial diagnosis of contagious abortion. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 24: 25-30.

5 — Dimock, W. W. and P. R. Edwards — 1936 — The diferencial of equine abortion with special reference to a hitherto undiscribed from of epizootic abortion of mares. *Cornell Vet.*, 26: 231-240.

6 — Dimock, W. W. — 1943 — Equine abortion. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 102: 282-284.

7 — Fujimura, S. — 1938 — Some observations on the infection with Bacillus abortus equi in horse. *13.º Internationaler Tierärztl. Kongress.* Zurich, 1: 532-537.

8 — Good, E. S. and L. S. Corbett — 1913 — Investigations of the etiology of infectious abortion of mares and jennets in Kenntucky. *Journ. Inf. Diseases*, 13: 53-68.

9 — Good, E. S. and W. W. Smith — 1914 — The bacillus abortivo equines as an etiological agent in infectious arthritis in colts. *Journ. Inf. Diseases*, 15: 347-349.

10 — Good, E. S. and W. W. Dimock — 1927 — The results of vaccination against contagious abortion in mares. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 24: 31-34.

11 — Heelsbergen, T. Van — 1913 — Abortus bei Stuten durch einen Paratyphus-B-Bacillus. *Centr. f. Bakt.*, Orig., 72: 38-70.

12 — Kasai, Kohonawa, Ogura et Ito — 1928 — Avortement infectieux des Juments au Japon. *Rec. Med. Vet.*, 104: 417.

13 — KELSER, R. A. — 1921 — Equine infectious abortion. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 12: 284-293.

14 — KILBORNE, F. S. — 1893 — An outbreak of abortion in mares. *U. S. D. Bureau Animal Industry*, Bull., 3: 49-52.

15 — KOON, G. H. and R. A. KELSER — 1923 — The control of equine infectious abortion in the U. S. Army. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 15: 193-196.

16 — MIESSNER, H. und R. BERGE — 1917 — Der Paratyphus abortus equi als Ursache des seúchenhaften Verfohlens in Deutschland. *Deut. Tier. Wochenschrift*, 25: 9.

17 — MURRAY, C. — 1919 — The cause of abortion in mares. *Journ. Inf. Diseases*, 5: 241-248.

18 — PANISSET, L. et J. VERGE — 1927 — Etiologie, diagnostic et prevention de l'avortement epizootique des juments. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 36: 129-139.

19 — RIGLOS, A. y P. R. JURADO — 1940 — El aborto infeccioso de los equinos y la Salmonella abortus equi. *Rev. Med. Vet.*, B. Aires, 22: 53-75.

20 — SMITH, TH. — 1893 — On a pathogenic bacillus from the vagina of a mare after abortion. *U. S. D. Bureau Animal Industry*, Bull. 3: 53-59.

21 — SAXER, E. — 1938 — Untersuchungen über die Abortussalmonellose der Pferde in der Ajoie. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 80: 137-155 e 198-211.

22 — SCHOFIELD — 1914 — The etiology of pyaemic arthritis in foals. *Journ. Inf. Diseases*, 15: 409-416.

23 — VERGE, J. — 1938 — La prophylaxie de l'avortement infectieux des juments provoqué par Salmonella abortus equi. *13.º Internationaler Tieräztl. Kongress.* Zurich, 1: 507-518.

24 — WATANABE, S. — 1937 — An outbreak of contagious abortion among mares and of joint ill among foals in norther part of Mandchukuo. "In" *Vet. Bull.*, 8: 754.

Vol. 14 — Art. 17 Dezembro de 1943

DISTRIBUIÇÃO TEÓRICA DE LESÕES EM FOLHAS OU FRUTAS, CAUSADAS POR INSETOS E OUTROS ANIMAIS OU POR AGENTES INFECCIOSOS TRANSMITIDOS POR VETORES

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Quando agentes infecciosos, capazes de produzir lesões distintas em folhas ou frutas, se distribuem ao acaso sôbre tais órgãos, como acontece por exemplo quando esporos de fungos causadores de manchas das folhas são disseminadas por correntes de ar, a distribuição de tais lesões é, teóricamente, si não forem muito numerosos esses agentes, a de Poisson. Em outras palavras, a probabilidade de uma folha apresentar, 0, 1, 2, 3, 4....k manchas é dada pela expressão

$$p = \frac{m^k}{k!} e^{-m} \qquad (1)$$

onde m é a média do número de manchas por folhas, k o número de manchas e **e** a base dos logaritmos neperianos.

O mesmo não acontece, entretanto, si as lesões são produzidas por um inseto, por exemplo, ou por agentes infecciosos transmitidos por insetos ou outros vetores, mesmo quando tais vetores são distribuidos ao acaso sôbre as folhas. Neste último caso a distribuição dos vetores é a de Poisson, mas como cada vetor pode produzir na mesma folha mais de uma lesão ou mancha, o número de folhas com uma mancha é inferior ao número fornecido pela série de Poisson calculada a partir da média do número de manchas por folha, ao passo que as folhas com números grandes de manchas são mais numerosas do que prevê a distribuição de Poisson. Veremos adiante um exemplo dessa natureza.

Si admitirmos que as probabilidades de um vetor causar 1, 2, 3,.... manchas por folha são respectivamente a, b, c, d,....., então as probabilidades de n vetores produzirem qualquer número de lesões numa mesma folha serão dadas pelo desenvolvimento do polinomio

$$(a + b + c + d + ...)^n$$

Si, de outra parte, designarmos por p_1, p_2, p_3,..... p_n as probabilidades de haver 1, 2, 3, 4,.....n vetores por folha, as quais se exprimem, a partir da expressão geral da série de Poisson (1) pela expressão:

$$p_n = \frac{m^n}{n!\,(e^m - 1)}$$

teremos finalmente, para as probabilidades de qualquer número de vetores por folha produzir nesta qualquer número de manchas, a expressão (1)

$$p_n\ (a + b + c + d + \ldots\ldots)^n \qquad (2)$$

Para que esta expressão seja exata, entretanto, é preciso que o número de manchas que um vetor causa por folha seja independente do número de vetores por folha, o que é provavelmente o caso quando os vetores são pequenos em relação à folha e quando seu número por folha é pequeno. Estas condições são aliás igualmente necessárias para que se possa aplicar a série de Poisson.

Não podemos conhecer pela observação o número de vetores por folha, mas a média m pode ser calculada devido a uma notavel propriedade da série de Poisson. O seu primeiro têrmo, relativo ao caso de folhas sem manchas e portanto sem vetor, contem essa média m. De fato esse têrmo é

$$N\ e^{-m}$$

onde N é o total das folhas. No caso que examinaremos a seguir, por exemplo, foram encontradas em 5.000 folhas, 3.658 folhas sem manchas. Si a hipótese de uma distribuição dos vetores ao acaso for aí aplicavel, a média do número de vetores por folha será dada pela resolução da equação

$$3658 = 5000\ e^{-m}$$

ou seja

$$m = 0{,}3125$$

Esta media nos permite calcular os têrmos seguintes da série de Poisson e portanto determinar o número de folhas com 1 vetor, com 2 vetores, etc.

Êsse número consta da 4.ª coluna da tabela II.

Finalmente, si conhecermos as probabilidades a, b, c, ... de um vetor causar 1, 2, 3, ... manchas, poderemos, aplicando a relação (2), calcular a distribuição teórica das manchas nas folhas. Inversamente, a partir da distribuição encontrada poderemos calcular a, b, c, ... pela aplicação de (2).

(1) E' evidente que a distribuição definida por esta expressão pode se encontrar em muitos outros problemas de biologia. Em geral, dado um certo número de fatores, distribuidos ao acaso de acôrdo com a série de Poisson, e suscetiveis de causar, cada um deles, determinado efeito que pode ser produzido 1, 2, 3,..... vezes com as probabilidades respectivas a, b, c,....., a distribuição de tais efeitos obedecerá à lei de probabilidade definida pela expressão (2). Cf. a nota (2), página 246.

Consideremos novamente o polinomio

$$(a + b + c + d + \ldots\ldots)^n$$

O seu desenvolvimento para muitos têrmos iguais a a, b, c, d,....., e para valores grandes de n, é extremamente complexo, mas podemos simplificar o problema: 1.º calculando êsse desenvolvimento sómente para os valores baixos de n, 1, 2, 3, 4 e 5, por exemplo. No exemplo que damos a seguir, a probabilidade de haver 5 vetores se reduz a 0,00002, e para mais de 5 essa probabilidade é ainda menor, pelo que não a precisaremos considerar; 2.º limitando os têrmos entre parênteses a 6, exprimindo respectivamente a probabilidade de um vetor produzir 1, 2, 3, 4, 5 e mais de 5 manchas. Podemos assim proceder porque a soma dos têrmos entre parênteses deve forçosamente ser igual a 1, correspondente à soma de todas as probabilidades dos vetores causarem qualquer número de manchas. A probabilidade de um vetor causar mais de 5 manchas será portanto igual a

$$1 - (a + b + c + d + e)$$

3.º considerando exclusivamente as probabilidades fornecidas pelo desenvolvimento do polinomio relativas a 5 manchas ou menos de 5 manchas, por exemplo, por folha, produzidas por qualquer número de vetores. Neste exemplo, naturalmente o maior número de vetores que podem produzir 5 manchas numa folha, é cinco.

O desenvolvimento do polinomio assim reduzido pelas três condições impostas é relativamente simples e consta da tabela I.

TABELA I

Expressões das probabilidades de 1, 2, 3, 4, 5 vetores causarem 1, 2, 3, 4, 5 e mais manchas

MANCHAS	VETORES				
	1	2	3	4	5
1	ap_1				
2	bp_1	a^2p_2			
3	cp_1	$2abp_2$	a^3p_3		
4	dp_1	$(2ac+b^2)p_2$	$3a^2bp_3$	a^4p_4	
5	ep_1	$2(ad+bc)p_2$	$3(a^2c+ab^2)p_3$	$4a^3bp_4$	a^5p_5
Soma	f_1p_1	f_2p_2	f_3p_3	f_4p_4	f_5p_5
Mais de 5 manchas	$(1-f_1)p_1$	$(1-f_2)p_2$	$(1-f_3)p_3$	$(1-f_4)p_4$	$(1-f_5)p_5$

Multiplicando as probabilidades calculadas a partir das expressões da tabela I pelo número total das folhas manchadas e somando os resultados de cada linha, encontraremos o número teórico de folhas com 1, 2, 3, 4, 5 e mais manchas.

Para fazer êsse cálculo seria necessário conhecermos as probabilidades a, b, c, d, ... Poderemos, por exemplo, estabelecer uma hipótese plausivel sôbre essas probabilidades e verificar si os valores calculados são bastante próximos dos observados, o que confirmaria essa hipótese e mais a da distribuição do vetor ao acaso. Ou então, a partir dos valores observados, poderemos calcular as probabilidades a, b, c, ... e talvez descobrir a lei que rege tais probabilidades, si, bem entendido, se verifica, no caso, a hipótese inicial de uma distribuição dos vetores ao acaso (2).

APLICAÇÃO ÀS MANCHAS DE LEPROSE EM FOLHAS DE CITRUS

A leprose é uma doença dos Citrus caracterisada por manchas ou lesões formadas nas folhas, frutas e galhos. Estudos recentes na Argentina (3) indicam que a leprose é uma doença de virus transmitida por ácaros. Contrariamente à maioria das doenças de virus, a leprose não é uma doença sistémica, e as lesões que produz são de natureza puramente local. O agente da doença não existe fora das manchas. Esses fatos explicam por que, de acôrdo com as experiências ainda inéditas do autor, é possível impedir a formação das manchas das frutas colocando-as, ainda muito novas, em vasos de vidros fechados por tampão de algodão, deixando-as, assim protegidas, no pé, ao abrigo dos vetores, até completa maturação. De outro lado, as experiências de pulverização, do autor, mostram que a leprose pode ser controlada eficientemente por inseticidas como as emulsões de óleo mineral e a

---

(2) O Dr. C. A. Williams, a quem mostrei as provas do presente trabalho durante a sua recente visita, chamou a minha atenção para uma publicação de G. Beall (The fit and significance of contagious distributions when applied to observations on larval insects. Ecology 21:460-474. 1940) em que é discutida a distribuição, em determinadas áreas, de larvas de insetos provenientes da eclosão de grupos de ovos distribuidos ao acaso por estas áreas. O Dr. Beall teve a gentileza de remeter-me por via aérea a parte principal do referido trabalho de modo a permitir a inserção da presente nota.

Aplicando os trabalhos de J. Neyman, Beall emprega três tipos de distribuição, A, B, C, os quais, com particularidade do último, ajustam-se satisfatoriamente aos dados experimentais. O método de Beall permite, a partir dos momentos empíricos da distribuição observada, calcular uma estimativa dos dois parámetros m_1 e m_2, correspondentes, respectivamente, à média dos grupos de ovos por área e à média, por grupo, do número de ovos que eclodem. Os dois parámetros são suficientes para calcular completamente a distribuição teórica cujo ajustamento aos dados experimentais é verificado pela prova de χ^2.

Nenhum dos tres tipos de distribuição de Beall ajusta-se satisfatoriamente à distribuição das folhas com manchas de leprose no exemplo que damos a seguir. E' isto, sem dúvida, devido ao fato que a distribuição do número de lesões causadas por um inseto numa folha não obedece à lei que rege a distribuição do número de larvas que nascem de grupos de ovos. E' obvio, porém, que uma distribuição composta, dêsse tipo, poderia ser estabelecida pelo mesmo método adotado por Beall, baseada em alguma hipótese plausivel sôbre a distribuição das lesões causadas por um inseto. Uma tal distribuição, provavelmente, se ajustaria bem aos dados da observação.

(3) Marchionatto, J. B. — 1938 — Transmission de la "lèpra explosiva" par les acariens. Mon. Int. Prot. Plantes. 12:6:121M - 122M.

calda sulfo-cálcica. As manchas de leprose nas folhas se enquadram portanto no caso que acabamos de examinar teóricamente.

Foram contadas as folhas apresentando 0, 1, 2, 3, 4, 5 e mais de 5 manchas, de um total de 5.000 colhidas ao acaso (4) em um pomar com ataque bastante grave de leprose.

Essa contagem deu o resultado constante da tabela II.

Na mesma tabela mencionamos o número teórico de vetores por folha, calculado, conforme ficou explicado acima, a partir do primeiro têrmo da série de Poisson, que forneceu a média m = 0,3125. O segundo têrmo, por exemplo, é

$$Nm\, e^{-m} = 5000 \times 0{,}3125\, e^{-0{,}3125} = 1143{,}2$$

Si portanto houve 1143,2 folhas com um vetor, das quais 478 apresentavam uma mancha, nas 665 folhas restantes o vetor deve

TABELA II

Número de folhas com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e mais de 5 manchas de leprose e número teórico de folhas com 0, 1, 2, 3, 4, vetores, baseado na hipótese de que esses vetores se distribuem de acôrdo com a série de Poisson para o mesmo número de folhas sem vetores, em 5.000 folhas de laranjeira doce

Número de manchas	Número de folhas	Número de vetores	Número de folhas
0	3.658	0	3.658
1	478	1	1.143,2
2	274	2	178,6
3	167	3	18,6
4	129	4	1,5
5	84	5	0,1
mais de 5	210		

ter produzido mais de uma mancha, estando elas portanto incluidas no total das folhas com 2 ou mais manchas. Justamente por êsse motivo o número de folhas com 2, 3, 4, vetores é inferior ao número de folhas com 2, 3, 4, manchas.

Podemos então organizar uma tabela igual à tabela I, onde substituiremos p_1, p_2, p_3, p_4, ... pelos seus valores respectivos. Calcularemos em seguida a, b, c, d,..... sucessivamente, a partir dos valores observados de folhas com 1, 2, 3, 4, ... manchas. Si N_k fôr o número total de folhas manchadas, teremos, por exemplo, para as folhas com uma mancha:

(4) Em um pomar de laranjeira doce (*Citrus sinensis* Osb.) em Jacareí, Estado de São Paulo, por gentileza de O. Giannotti.

$$N_k\, ap_1 = 1342 \times 0{,}852\ a = 478$$

donde tiramos

$$a = 0{,}418$$

Conhecendo a, podemos na segunda linha substituir a^2 pelo seu valor 0,175 e calcular b, da equação :

$$N_k\ (bp_1 + a^2p_2) = 1342\ (0{,}852\, b + 0{,}175 \times 0{,}133) = 274$$

Da mesma forma, conhecendo a e b, poderemos calcular c com os elementos da terceira linha, multiplicados por N_k, e assim por diante.

A tabela III dá-nos o resultado de tais calculos. Afim de destacar os valores das diversas probabilidades não efetuamos a multiplicação de cada têrmo por p_1, p_2, p_3, p_4, etc., que entretanto mencionamos em cima de cada coluna. Vê-se que a soma das probabilidades de cada coluna é igual a 1. Multiplicadas pelo valor correspondente de p_1, p_2, etc. e somadas para todas as colunas, temos igualmente um total igual a 1, conforme se deve esperar.

TABELA III

Probabilidades de 1, 2, 3, 4 ou 5 vetores causarem 1, 2, 3, 4, 5 ou mais manchas, quando o total das folhas manchadas é o da última coluna e a probabilidade de haver 1, 2, 3, 4 ou 5 vetores é o da primeira linha da tabela

Manchas	Vetores					Total
	1	2	3	4	5	
	0,852	0,133	0,014	0,001	0,0001	
1	0,418					478
2	0,212	0,175				274
3	0,117	0,178	0,073			167
4	0,089	0,143	0,111	0,031		129
5	0,052	0,124	0,118	0,062	0,013	84
mais de 5	0,112	0,381	0,698	0,907	0,987	210
						1.342

Finalmente, multiplicando êsses produtos por 1.342, número total de folhas manchadas, temos a distribuição das folhas de acôrdo

com o número de vetores e o número de manchas. Essa distribuição consta da tabela IV.

TABELA IV

Distribuição de 5.000 folhas de acôrdo com o número de manchas e o número de vetores, calculada a partir das probabilidades da tabela III

Manchas	Vetores					Total
	0	1	2	3	4	
0	3.658					3.658
1		478,0				478
2		242,8	31,2			274
3		133,9	31,7	1,4		167
4		101,3	25,5	2,1		129
5		59,6	22,1	2,2	0,1	84
mais de 5		127,6	68,0	13,0	1,3	210
Total	3.658	1143,2	178,5	18,7	1,4	5.000

Conforme dissemos acima, a partir dos valores observados, — isto é, do número de folhas com 0, 1, 2, 3, 4, ... manchas, — que nos fornecem, pela aplicação da distribuição teórica que acabamos de estudar, as probabilidades a, b, c, d, ..., podemos descobrir a lei que rege tais probabilidades, ou seja a lei das probabilidades de um vetor causar 1, 2, 3, 4, 5 manchas por folha.

Ou então, o que volta ao mesmo, podemos, a partir dos números da terceira coluna da tabela IV relativos às folhas com um só vetor, procurar a lei que rege a distribuição do número de manchas produzidas por um vetor. Esses números são os seguintes:

478 242,8 133,9 101,3 59,6

para 1 a 5 manchas. E' facil verificar que os logaritmos desses números se distribuem, em relação ao número de manchas, aproximadamente em uma linha reta. Isto significaria que a frequência das folhas, de acôrdo com o número de manchas produzidas por um vetor, é dada por uma equação exponencial.

Pode haver neste fato uma simples coincidência, mas êle se torna mais significativo si admitirmos que o número de manchas produzidas numa folha por um vetor é proporcional ao tempo de permanência dêsse vetor na referida folha. Nessas condições, a equação exponencial exprime simplesmente que, sendo N o número de vetores pousados nas folhas a qualquer momento, o número dN dentre êles,

que abandonam as folhas durante o tempo infinitamente pequeno dt, exprime-se pela relação:

$$dN = k\ N\ dt$$

onde k representa um fator de proporcionalidade.

E' esta, sem dúvida, a hipótese mais simples que se pode fazer sôbre o tempo de permanência de um vetor sôbre uma folha. A sua verificação, entretanto, no caso do vetor da leprose, é praticamente inexequivel por motivos obvios.

Procurei verifica-la com o tempo de pouso da mosca doméstica, *Musca domestica* L. A descrição desta experiência é dada a seguir, principalmente pelo interêsse que ela pode apresentar em outros estudos.

A experiência consistio em colocar, num local onde havia moscas em abundância, isto é, um dos patios do bioterio do Instituto Biológico, um retangulo de papel, de côr branca ligeiramente amarelada, medindo 72 × 42 centímetros. As observações foram feitas em 8 dias diferentes, entre 20 de Outubro e 17 de Novembro, entre 15 e 17 horas, com sol ou com ceu ligeiramente nublado. A temperatura, durante essas observações, manteve-se entre 18 e 32°C, geralmente em torno de 25°. Foi registado o tempo decorrido entre o momento em que as moscas vinham pousar na superfície e o em que a abandonavam, quer sem motivo aparente, quer porque eram perturbadas por outras moscas, quer ainda porque saíam em perseguição de outras que passavam nas proximidades. Acredito que êstes dois últimos casos somente poderiam alterar as constantes da distribuição, sem modificar sua essência.

O número de moscas que permaneceram entre 0 e 9,9, 10 e 19,9, 20 e 29,9,..... segundos, ou seja, classes de 10 em 10 segundos, até 2 minutos, foi respectivamente:

727, 154, 49, 25, 10, 7, 6, 8, 4, 0, 2 e 2

e 6 moscas permaneceram mais de 2 minutos. Como é fácil verificar não é possível ajustar uma equação exponencial a estes dados, por ser muito maior do que deveria o número de moscas que permaneceram longo tempo sôbre a superfície de observação.

Não encontra, pois, apoio nesta experiência a hipótese de que o tempo de permanência do vetor da leprose segue uma equação exponencial o que entretanto, não é suficiente para invalidar a referida hipótese.

Para terminar, queremos assinalar que o estudo estatístico da distribuição das manchas das folhas numa doença de virus pode con-

tribuir para se verificar si tais manchas são de origem interna, como resultado de uma infecção sistémica, ou si, ao contrário, provêm da inoculação do agente infeccioso por um inseto vetor. No primeiro caso pode-se frequentemente esperar uma distribuição das manchas ao acaso em todo o vegetal, o que se verifica pela possibilidade de se ajustar uma série de Poisson aos dados da observação. No segundo caso pode-se esperar a distribuição que acaba de ser examinada.

THEORETICAL DISTRIBUTION OF LESIONS ON LEAVES AND FRUITS CAUSED BY INSECTS AND OTHER ANIMALS OR BY AGENTS TRANSMITTED BY ANIMAL VECTORS

Abstract

When lesions on leaves and fruits are produced by infectious agents randomly distributed on the surface of the organs, a Poisson distribution of the number of leaves or fruits with 0, 1, 2, 3, ...k lesions is observed, provided the number of agents is not large.

If, however, lesions are produced or transmitted by an insect, for instance, a single insect may produce more than one lesion and the distribution, if the insects are randomly distributed, is given by the expansion of the polynome.

$$p_n (a+b+c+d+ \ldots\ldots)^n$$

where p_n is the probability of there being n vectors on any leaf, as given by the Poisson distribution, and a, b, c. d..... the probabilities of any insect producing 1, 2, 3, 4, ... lesions per leaf.

An example is given of the application of this distribution to the number of sweet orange leaves with 0, 1, 2, 3, 4, 5 and more than 5 lesions, of leprosis in 5000 leaves collected at random in an orchard in the State of São Paulo.

The calculated number of leaves with 1, 2, 3, 4 and 5 lesions caused by one vector is, respectively:

478 242,8 133,9 101,3 and 59,6

The logarithms of these numbers plotted against the number of lesions fall approximately on a straight line, indicating that this distribution might be represented by an exponential equation.

This is to be expected if: 1.º the number of lesions produced by a vector is proportional to the time it remains on the leaf. 2.º given a number of vectors on the leaves, the number, among them, that will abandon the leaves during the infinitesimally small interval of time dt is proportional to the number of vectors.

An attempt to verify this hypothesis in the case of the time the common house-fly (Musca domestica L.) remains on a given surface yielded however a different distribution.

It is pointed out that the statistical study of the distribution of discrete lesions on leaves or fruits in virus diseases may lead to the discovery of whether the disease is systemic or locally transmitted by a vector. In the first case the distribution may often be expected to follow the Poisson distribution. In the second case the distribution is more likely to be the one discussed in the paper.

Vol. 14 — Art. 18 Dezembro de 1943

ESTUDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE TOXINA DIFTÉRICA DE ALTO VALOR ANTIGENICO (40-60 Lf) EM CONDIÇÕES FACILMENTE REPRODUTIVEIS

POR

O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

E' sabido que a produção da toxina diftérica está frequentemente sujeita, na prática, a dificuldades imprevistas, pois uma técnica que fornece resultados excelentes em certos laboratórios, falha, por vezes, completamente, noutro, e, não raro, num mesmo laboratório o rendimento de toxina varia entre limites muito amplos, dependentes de condições experimentais incontroláveis.

Despertaram, por isso, justo interesse os trabalhos de MUELLER (1) e os de MUELLER & MILLER (2), nos Estados Unidos, os quais conseguiram estabelecer a receita de um meio de cultura facilmente reprodutível, onde a amostra Park 8 "Toronto" cresce abundantemente e produz com regularidade toxinas de alto valor floculante (60 e até 100 Lf). Trata-se de um hidrolisado acido de caseina, preparado com técnica adequada (3) e adicionado de maltose, cloreto de calcio, cistina, traços de certos sais ($MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MnCl_2$), tres fatores acessórios de crescimento (acido nicotínico, acido pimélico e beta-alanina), mais uma quantidade optima de ferro.

O plano geral de preparo do meio de MUELLER, tal como se procede atualmente no "Massachussets Antitoxin and Vaccine Laboratory, Forest Hills, Boston" (1), consiste na adição de maltose e cloreto de calcio dirétamente ao hidrolisado, enquanto que os demais ingredientes são adicionados de tres soluções "stock" (sol. de cistina, sol. de sulfato ferroso e solução de acessórios e metais).

O presente trabalho conduziu a uma confirmação dos resultados de MUELLER, bem como a uma modificação do meio de cultura desenvolvido por esse autor, substituindo o hidrolisado acido de caseina, de obtenção demasiado laboriosa e complicada, pelo hidrolisado pépsico de estômagos de porco, segundo MARTIN, cuja técnica de preparo é já bem conhecida dos bacteriologistas e que, como se sabe, tem sido constantemente aperfeiçoada para o fim particular da produção da toxina difterica nos laboratórios do Instituto Pasteur de Paris (4).

(1) Comunicação pessoal da Snrta. S. JOHNSON, em Novembro de 1941.

I

PREPARO DO HIDROLISADO ACIDO DE CASEINA

500 gramas de caseina comercial são misturadas em um balão Pyrex de 5 litros a 2 litros de HCl concentrado e 500 cm^3 de água distilada.

Ferve-se com refluxo durante 18 horas (fracionadamente, em tres dias sucessivos) e concentra-se, sob pressão reduzida, com uma bôa trompa d'água, até obter-se um residuo semi-sólido.

Ao residuo negro, então dissolvido em 4 litros de água fria, é adicionado carvão animal para o descorar : junta-se um "beaker" de 250 cm^3 cheio de carvão animal, mistura-se bem e filtra-se. No filtrado repete-se o descoramento, usando-se porém apenas metade do carvão. O segundo filtrado deverá ter uma coloração amarelo-pálida, pois a melanina é quasi totalmente adsorvida pelo carvão.

Em seguida, é necessário remover o excesso de HCl existente no hidrolisado sob a forma de um sal pouco solúvel, uma vez que uma concentração excessiva de NaCl, como demonstraram MUELLER & MILLER (2), perturba a produção de toxina.

Toma-se então o filtrado, de reação fortemente acida, completa-se o volume para 6 litros com agua distilada e adiciona-se-lhe 780 g. de litargírio, do qual se prepara uma suspensão espessa em cêrca de 200 cm^3 de agua, deixando-se sedimentar as particulas maiores e adicionando-se pouco a pouco ao hidrolisado, até obter-se reação neutra ao papel de vermelho Congo.

Após passagem através de papel de filtro, em Buchner, resulta um filtrado claro e apenas levemente amarelado (remoção de mais melanina pelo $PbCl_2$).

Cumpre retirar, então, o excesso de Pb; para o fazer, seguimos, a princípio, a técnica indicada por MUELLER & JOHNSON (3), isto é, a adição de sulfureto de bário seguida da de H_2SO_4, afim de conduzir à formação de $BaSO_4$, insolúvel e de H_2S que se liberta e vai insolubilizar o Pb, sob a forma de sulfureto. 150 g. de sulfureto de bário foram dissolvidos em 500 cm^3 de água fervendo e 2/3 desta solução, adicionados ao hidrolisado. Após fervura rápida, adicionaram-se 2/3 (100 cm^3) de uma solução de 55 cm^2 de H_2SO_4 concentrado em 100 cm^3 de água distilada. A adição de H_2SO_4 deve ser feita pouco a pouco, até chegar-se a um ponto em que a solução de amino-acido, que decanta facilmente deixando um sobrenadante claro, contenha um definido excesso de H_2S (verificado com papel de acetato de chumbo) e apenas um pequeno excesso de SO_4 (verificado com uma sol. de cloreto de bário).

O excesso de SO_4 pode ser depois facilmente removido com hidróxido de bário, porém um certo excesso de Pb sempre permanece em solução.

Neutralizando-se a hidrolisado com soda até pH 7,0 e deixando-se durante a noite na geladeira, forma-se um precipitado preto (PbS), bem como uma quantidade adicional de $BaSO_4$, que se podem remover facilmente por filtração em Buchner.

O método acima descrito, de remoção do Pb, pareceu-nos porém inutilmente complicado; por isso, ao preparar posteriormente novas partidas do hidrolisado, após a remoção do HCl pelo litargírio, tratamos diretamente o filtrado por uma corrente de H_2S produzida em um "Kipp", que se faz borbulhar diretamente durante 1-2 horas. Após uma noite de permanencia na geladeira, filtra-se, e o filtrado é em seguida aquecido sob pressão reduzida, o que satisfaz ao duplo fim de concentrar (geralmente concentramos de 6 para 4 litros) e de eliminar o excesso de H_2S.

Obtido assim o hidrolisado, cumpre retirar-lhe o ferro, o que facilmente se consegue sob a forma de um precipitado complexo de fosfato de calcio e ferro. A 3 litros do hidrolisado adicionam-se cêrca de 20 g. de Na_2HPO_4 e de KH_2PO_4 dissolvidos em 300-400 cm^3 de água quente, mais NaOH, em solução concentrada, até pH 7,8-8,0. Aquece-se filtra-se, (1) e testa-se o filtrado para ferro. Havendo ainda um teor elevado de ferro, adiciona-se 1 g. de $CaCl_2$ (dissolvido em cêrca de 15 cm^3 de água). Novo aquecimento e filtração. Desta vez o filtrado contém geralmente apenas 10-20 γ de Fe por cm^3, o que representa um teor satisfatoriamente baixo para o fim da produção da toxina diftérica. Abandonando-se na geladeira durante alguns dias, forma-se um abundante precipitado de tirosina, sob a forma de cristais, que serão separados por filtração antes do preparo do meio.

Um fator sôbre o qual MUELLER & MILLER chamam particularmente a atenção e que tambem verificámos ser de grande importância é o teor de NaCl que, no meio final, não deve exceder de 0,5%. Tivemos ocasião de verificar que o hidrolisado de caseina preparado de acôrdo com a técnica primitiva de MUELLER (descoramento pelo carvão e neutralização direta do filtrado com NaOH) apresenta frequentemente um teor por demais elevado de NaCl e não se presta à produção de toxinas potentes. As mesmas partidas de hidrolisado, quando tratadas pelo litargírio, como acima descrito, deram filtrados pobres em NaCl, susceptiveis de fornecer toxinas de 40-50 Lf por cm^3.

(1) Dificilmente encontramos papel de filtro adequado para o trabalho com toxina diftérica, pois a maioria dos pápeis existentes no comércio se acha contaminada por quantidades conspícuas de ferro. Não raro, porém, encontramos o algodão hidrófilo satisfatório. Muito conveniente é o uso do algodão de vidro e dos filtros de Jena, que se podem lavar perfeitamente com solução sulfo-crômica e água distilada.

II

RESULTADOS OBTIDOS COM O MEIO DE MUELLER

Experiências comparativas foram feitas com o hidrolisado de caseina obtido de acôrdo com a técnica precedentemente descrita e um hidrolisado de caseina pulverulento da fabrica "Difco", controlado pelo próprio Dr. MUELLER.

Omitindo pormenores de técnica, que figuram em *addendum*, a preparação dos meios de cultura foi feita de acôrdo com as seguintes fórmulas :

(1) Meio preparado com hidrolisado de caseina "Difco".

Hidrolisado de caseina pulverulento, "Difco"	15,44 g.
Maltose "Merck"	9,0 g.
Sol. a 10% de $CaCl_2$	0,9 cm³
Sol. de cistina	0,6 cm³
Sol. de acessórios e metais	1,2 cm³
Água distilada q. s.	600 cm³

(2) Meio preparado com hidrolisado de caseina do laboratório.

Hidrolisado de caseina (12,4 mg N/cm³) (1)	200 cm³
Sol. a 10% de $CaCl_2$	1,5 cm³
Sol. de cistina	1,0 cm³
Sol. de acessórios e metais	2,0 cm³
Água distilada q. s.	1000 cm³

Em ambos os casos foi o pH ajustado cuidadosamente a 6,9 e o meio autoclavado durante 10 minutos a 115°, sendo os balões retirados imediatamente do autoclave, afim de evitar qualquer aquecimento adicional desnecessário.

Ajustando o pH a 6,9 ao invez de a 7,4-7,6 como está descrito nos trabalhos de MUELLER & col. (1, 2), pode-se, sem inconveniente, adicionar a maltose diretamente ao meio, o que representa, na prática, sobretudo em se tratando da produção em larga escala, uma notavel simplificação (2).

Nas fórmulas precedentes falta um ingrediente de fundamental importancia : o sulfato ferroso, cuja quantidade optima deve ser previamente determinada, em pequenas porções do meio, conforme está indicado no capitulo seguinte.

---

(1) MUELLER recomenda uma concentração final de proteina de cêrca de 1,6% ou sejam 0,26% em N. Como a solução de amino-acidos continha 12,4 mg. de N/cm3, isto é, 1,24% de N, foi ela diluida 5 vezes (de 200 até 1000 cm3).

(2) Por esta importante particularidade técnica e outras que nos foram referidas pela Srta. Sylvia Johnson, por ocasião do breve estágio que fizemos no Mass. Antitoxin & Vacine Lab., Forest Hills, Boston, em Novembro de 1941, aproveitamos a oportunidade para apresentar-lhe os melhores agradecimentos.

Toxinas de cêrca de 50 Lf foram facilmente obtidas em ambos os hidrolizados, com um optimo de ferro geralmente proximo de 3-6 γ para 20 cm³.

III

EXPERIÊNCIAS COM UM MEIO, USANDO-SE PEPTONA MARTIN COMO FONTE DE N

350 g. de estomago de porco passado na máquina são misturadas com 1 litro de água distilada contendo 10 cm³ de HCl concentrado (d-1,19), à temperatura de 50° C. Deixa-se em banho-maria a 45-48° C, durante 24 horas. Aquece-se, então, a 80°, para sustar a digestão enzimática, e alcaliniza-se ao ponto de viragem da fenolftaleina, usando sol. a 40 % de NaOH. Aquece-se a cêrca de 95° até que o precipitado se conglomere em largos flocos (1), e filtra-se em papel.

A 1 litro do filtrado, adicionam-se 5 g. de extrato de carne (2) ("Lemco"), aquece-se a 80° C para dissolver e adicionam-se 5 g. de Na_2HPO_4 (anidro), 1,7 g. de KH_2PO_4 (dissolvidos em 30-40 cm³ de água distilada), mais 5 cm³ de uma sol. a 10% de $CaCl_2$.

Ajusta-se a reação a cêrca de pH 7,8 - 8,0 com NaOH a 40% e ferve-se durante alguns minutos, agitando frequentemente o balão.

Quando o precipitado estiver bem floculado, inverte-se um "beaker" sôbre o colo do balão, que é resfriado sob uma corrente de agua fria. Após o esfriamento, procede-se à filtração. Daqui em diante, porém, será preciso evitar a menor contaminação do filtrado pelo ferro e, por isso, deve-se prestar atenção especial ao papel de filtro, algodão, etc. ou qualquer outro material que se vai usar para a filtração. O filtrado será testado para ferro, como está indicado em *addendum*. Se o teor em ferro não fôr superior a 20 gamas em 20 cm³ (1 γ/cm³), a solução de peptona será, então, levada a pH 7,0 e adicionada dos mesmos ingredientes que figuram no meio de MUELLER. Antes, porém, de se proceder ao preparo do meio definitivo, é necessário ajustar a quantidade optima de ferro requerida para a produção da toxina.

Verificação do optimo de ferro — A 125 cm³ da solução de peptona-extrato de carne, pH 7,0, adicionar 2 g. de maltose ("Merck"), 2 cm³ de $CaCl_2$ 1%, 0,12 cm³ da solução de cistina e 0,24 cm. da sol. de A & M. Ajustar cuidadosamente o pH a 6,8 - 6,9 e distribuir 20 cm³ do meio em uma série de balões de Erlenmeyer, de 125

(1) No preparo da solução de peptona Martin, tal como descrito por RAMON, a eliminação da maior parte do ferro é assegurada pela precipitação flocular obtida em reação alcalina (fosfatos complexos de cálcio e ferro).

(2) Observações anteriores de COSTA CRUZ, no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F., já haviam mostrado que se obtêm excelentes toxinas em peptona Martin diretamente reforçada, sem diluir, mediante a junção de extrato de carne "Lemco". Outras qualidades de extrato (v. g. "Armour") não deram resultados tão bom como o extrato "Lemco".

cm³, aos quais previamente se adicionaram as seguintes quantidades de uma solução a 1/10.000 de $FeSO_4$ (em 1% HCl): O — 0,03 — 0,06 — 0,09 — 0,12 e 0,15 cm³. Inverter um "beaker" de 30 cm³ sôbre cada balão e autoclavar 10 minutos a 115° C. Semear com uma alça de pele de uma cultura de 24 hs. da amostra "Toronto" em caldo simples e incubar a 37° C (ou, melhor, a 35°) durante 8 dias. Filtrar (ou centrifugar) e verificar o título da toxina por floculação. Anotar o teor optimo de ferro para a produção da toxina. Exemplos:

Partida N.° 1			Partida N.° 2	
Ferro em γ/cm³	Lf/cm³	Tempo de floculação (em minutos)	Lf/cm³	Tempo de floculação (em minutos)
0	42	14	53	3
3	42	14	53-64	8
6	53	16	53	10
9	42-53	11	53-64	10
12	42	11	42	10
15	32	15	—	—

No caso da partida 1, devemos tomar como optimo de Fe 9 γ/20 cm³, ao passo que, no caso da partida 2, não há um optimo definido, parecendo que entre 9 e 12 gamas, as toxinas obtidas foram comparáveis, quer em relação à potencia (53-64 Lf), quer em relação à velocidade de floculação (10 minutos).

PREPARAÇÃO DO MEIO FINAL

Exemplo (para a partida n.° 1):

Peptona Martin-extr. carne, pH 7.0	1 litro
Maltose ("Merck")	15 gramas
$CaCl_2$ 10%	1,5 cm³
Sol. de cistina	1,0 cm³
Sol. de A & M	2,0 cm³
Sol. de sulfato ferroso 1/10.000	4,5 cm³

Misturar cuidadosamente. Aquecer 1/2 hora em vapor fluente. Filtrar. Reajustar a pH a 6,8-6,9, distribuir (1) e esterilizar a 115° durante 15 minutos, retirando os balões logo que o autoclave esfriar, afim de evitar qualquer aquecimento desnecessário.

A semeadura é feita com alça de 8-10 mms., a partir de peles de 24 horas obtidas em frascos de Erlenmeyer com caldo simples. A fil-

(1) Como recipiente para a produção de toxina temos usado balões "Gomes" (Rio de Janeiro) para difteria (porções de 1 litro) ou, melhor ainda, garrafas de tipo Roux (capacidade de 3 litros), de fabricação da vidraria Sta. Marina, S. Paulo, para porções de 600 cm3.

tração da toxina é feita após 8 dias de incubação a 35°. Já após 24 horas, forma-se uma película, que se torna bastante espessa após 48 horas, cái no fundo do balão no 4.°-5.° dia e se constitúe novamente, embora não com a mesma intensidade, até o 8.° dia.

ADDENDUM

1. PESQUISA DE FERRO NO MATERIAL DESTINADO AO PREPARO DA TOXINA DIFTÉRICA

I) — No hidrolisado de caseina ou na sol. de peptona Martin.

Tomar 20 cm^3 do hidrolisado ácido ou do hidrolisado péptico e adicionar 0,5 cm^3 de $CaCl_2$ a 1%, 2 gotas de vermelho de fenol a 0,2% e NaOH q. s. para elevar o pH a 7,8. Aquecer em banho-maria fervendo durante alguns minutos. Forma-se um precipitado floculento, que é separado por centrifugação. Dissolve-se o sedimento em 0,2 cm^3 de HNO_2 concentrado e adicionam-se 5 cm^3 de água distilada comprovadamente livre de ferro. Ferve-se novamente durante alguns segundos, deixa-se esfriar e adicionam-se 1 cm^3 de uma solução a 5 % de KSCN ou NH_4SCN e 1 cm^3 de alcool amílico ou isoamílico.

Agita-se bem, espera-se a separação da camada alcoólica e compara-se a côr obtida com a de padrões preparados a partir de 5 cm^3 de água contendo 5,10 e 20 gamas de ferro (0,05-0,1 e 0,2 cm^3 de uma solução a 1/10.000 de Fe $S0_4$. $7H_20$), adicionados semelhantemente de 0,2 de HNO^3, fervidos e tratados com tiocianato e álcool amílico. Será aceitavel o hidrolisado quando não contiver mais que o equivalente a 10-20 γ de ferro.

II) Na Maltose.

A 50 g. de maltose adicionar cerca de 60 cm^3 de água. Aquecer para dissolver, e completar o volume a 100 cm^3. Tomar 5 cm^3 desta solução, adicionar 15 cm^3 de água distilada e tratar como indicado acima.

III) Na água,. nas soluções de cistina e de acessórios & metais.

Para a água, tomar 5 cm^3, ferver cm 0,2 cm^3 de HNO_3, deixar resfriar e adicionar 1 cm^3 de KSCN e 1 cm^3 de álcool amílico.

Para a solução de cistina, tomar 0,2 cm^3 em 5 cm^3 de água e para a de A & M, 0,4 cm^3 no mesmo volume de água distilada (livre de ferro). Conduzir o test da mesma maneira descrita.

IV) Em papel de filtro, algodão, etc.

Tomar um fragmento do material (não cortar com tesoura !) e imergir em um tubo com 5 cm^3 de água adicionada de 0,2 cm^3 de HNO_3.

Ferver, deixar esfriar e completar o test como descrito precedentemente.

V) Test da vidraria utilizada.

Si se quer verificar a vidraria usada, basta autoclavar dentro do vasilhame a experimentar uma quantidade adequada de água distilada livre de ferro, adicionada de 0,2 cm³ HNO_3 para cada 5 cm³.

Após o resfriamento, adicionar a 5 cm³ de água, 1 cm³ de KSCN a 5% e 1 cm³ de álcoól amílico e comparar com a côr obtida nos tubos padrões.

2. SOLUÇÕES STOCK

I — Solução de cistina

Cistina	20 g.
HCl conc.	20 cm³
H_2O q. s.	100 cm³

Aquecer até completar a dissolução.

II — Solução de acessórios e metais (A & M)

$MgSO_4$ 7 H_2O	22,5 g.
Beta-alanina	0,115 g.
Acido nicotínico	0,115 g.
Acido pimélico	0,0075 g.
Sol. a 1% de $CuSO_4.5H_2O$	5 cm³
Sol. a 1% de $ZnSO_4.5H_2O$	4 cm³
Sol. a 1% de $MnCl_2.4H_2O$	1,5 cm³
HCl conc.	5 cm³
H_2O q. s.	100 cm³

Conservar na geladeira (a solução facilmente se contamina com cogumelos !).

III — Solução de ferro

$FeSO_4$ $7H_2O$	1 g.
HCl conc.	1 cm³
H_2O q. s.	100 cm³

Desta solução concentrada, preparar-se-á facilmente uma solução a 1/10.000, diluindo-a na proporção de 1% em Sol. de HCl a 1%.

3. MANUTENÇÃO DA AMOSTRA PARK 8 "TORONTO"

No "Mass. Antitoxin & Vaccine Lab.", a amostra Toronto é conservada mediante 2 repiques semanais da película desenvolvida em caldo simples ordinario, à temperatura ambiente. Entre nós, não havendo aquecimento das casas no inverno, o crescimento nem sempre se obtém à temperatura ambiente. Por isso mantemos as culturas durante a noite na estufa a 37° e depois trazêmo-las para a temperatura ambiente; é conveniente fazer duas repicagens semanais.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF DIPHTERIC TOXIN OF RELATIVELY HIGH POTENCY (40-60 Lf) ON A REPRODUCIBLE MEDIUM

Abstract

The work of MUELLER *(1939) and* MUELLER & MILLER *(1941) concerning the production of a powerful Diphtheric Toxin in a Casein medium has been confirmed. The importance of the NaCl and of the iron concentration, as emphasized by* MUELLER *& col. is fully recognised.*

By replacing the casein hydrolysate by an easily prepared meat peptic digest (Martin's peptone) a medium has been developed which yields a fairly strong diphtheric toxin (40-60 Lf.) Detailed directions for the preparation of the medium are given.

BIBLIOGRAFIA

1 — MUELLER, S. H. — 1939 — A simplified Formula for Diphtheric Broth. *Journ. Immunol.*, **37**: 103-112.

2 — MUELLER, S. H. & L. A. MILLER — 1941 — Production of Diphtheric toxin of High Potency (100 Lf) on a reproducible medium. *Journ. Immunol.*, **40**: 21-32.

3 — MUELLER, S. H. & E. R. JOHNSON — 1941 — Acid Hydrolysates of Casein to Replace Peptone in the Preparation of Bacteriological media. *Journ. Immunol.*, **40**: 33-38.

4 — RAMON, G. — 1939 — La production des toxines diphtérique, tétanique, staphylococcique en vue de l'obtention des anatoxines correspondantes. Techniques. Résultats. *Rev. d'Immunologie*, **5**: 385-404.

Vol. 14 — Art. 19 Dezembro de 1943

TINGITIDEOS AMERICANOS (HEMIPTERA)

POR

Oscar Monte

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto

O presente trabalho contem a descrição de 10 novas espécies de tingitideos e notas sôbre outras espécies de interesse para os estudos da fauna americana. Todos os tipos se acham depositados na coleção particular do autor, com exceção de *Leptopharsa livida*, que está na coleção do Instituto de Experimentação Agricola, Rio de Janeiro.

Subfamilia *CANTACADERINAE*

Phatnoma ovata CHAMPION

Um exemplar, Amparo, S. Paulo, em X-1942, colhido pelo Dr. TRAVASSOS FILHO. E' a primeira citação da espécie para a fauna brasileira.

Subfamilia *TINGITINAE*

Gargaphia argillacea, n. sp.

Fig. 1

Grande, larga, côr de argila, uma ou duas nervuras fuscas cortando a area costal, e algumas outras escurecidas dispersas pelos élitros.

Cabeça larga com espinhos mais ou menos curtos, o par anterior dirigido para frente, o posterior deitado sobre a superficie da cabeça, e o espinho mediano ereto.

Antenas longas, pilosas, castanhas, salvo o IV segmento, que tem o terço basal castanho e o restante preto. O primeiro segmento um pouco mais do dobro do segundo; o terceiro ligeiramente um pouco mais do dobro do quarto.

Vesicula medianamente desenvolvida, apertada, baixa e lançada sobre a cabeça.

Paranotos largos, erguidos para cima, arredondados, com nervuras fortes, quasi totalmente trisseriado, porem quadrisseriado oposto ao angulo umeral.

Pronoto com punturas pouco visiveis, levemente coberto de pêlos dourados; a porção triangular clara e largamente areolada. Carenas mui altas, largamente uniareoladas, as laterais curvadas para fora e a mediana formando um disfarçado angulo em sua metade.

Élitros largamente separados em suas extremidades, com um leve estrangulamento além do meio; area costal muito larga, formada de areolas largas e irregularmente dispostas, iniciando-se com tres carreiras, depois quatro, cinco, e até seis na sua maior largura, e com uma ou duas nervuras escuras e transversais; subcostal relativamente larga, bitrisseriada; discoidal larga com cinco carreiras de areolas na sua maior largura, e não alcançando a metade dos élitros, tendo as

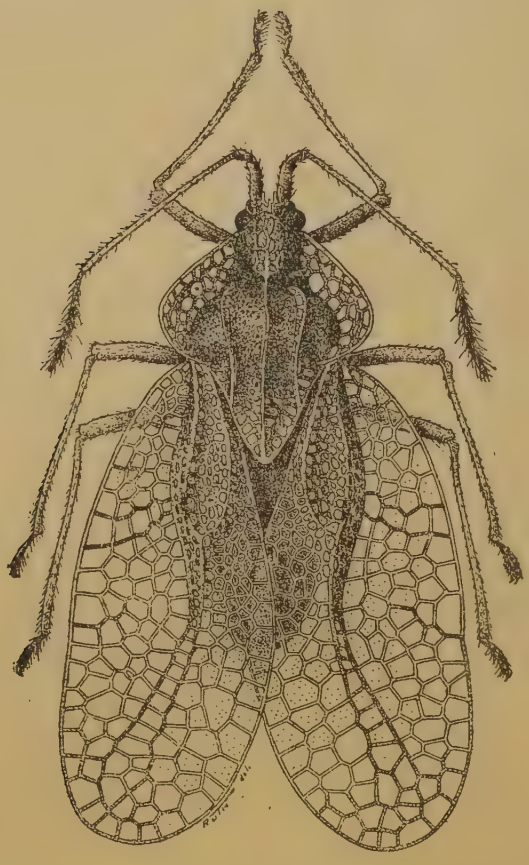


Fig. 1 - *Gargaphia argillacea* MONTE, n. sp.

nervuras mui salientes e uma pequena mancha escura junto ao apice e sobre a nervura que limita as areas discoidal e subcostal.

Bucula muito alta e larga. Patas longas. Parte inferior do corpo, argilacea.

Rostro não alcançando a lamina transversal.

Comprimento 4,13 mm; largura 2,60 mm.

Holótipo (macho) e um parátipo, colhido em Guarapuava, Paraná, pelo sr. MIGUEL CARVALHO LEITE, em outubro de 1943.

Perfeitamente distinta de qualquer espécie até o momento descrita.

Gargaphia subpilosa BERG

Fig. 2

Por gentileza do entomologista J. M. BOSQ e da Dra. CHIARELLI, recebemos material desta espécie que estava depositado nos laboratórios de Zoologia da Faculdad de Ciencias Exactas y Fisicas de Buenos Aires, onde BERG exerceu a cátedra. O lote consta de tres exemplares etiquetados por BERG, como *G. subpilosa* e que se acham um tanto es-

Fig. 2 - *Gargaphia subpilosa* BERG

tragados. Estes exemplares vieram confirmar todos os comentarios que fizemos em trabalho anterior (Arq. Inst. Biol., 11:301-308, 1940). Reproduzimos em desenho a espécie para que possa ser reconhecida pelos futuros estudantes de tingitideos.

Os exemplares concordam perfeitamente com a diagnose e com o exemplar por nós depositado no Museo de Ciencias Naturales, de Buenos Aires.

Leptopharsa livida, n. sp.

Fig. 3

Totalmente translucida, com rarissimas nervuras escuras. Cabeça saliente armada com cinco espinhos, sendo o par anterior curto e dirigido para frente; o espinho alongado e ligeiramente curvado para frente; o par posterior longo, ereto e dirigido para os lados.

Bucula pouco profunda. Rostro longo, alcançando o metaesterno.

Antenas longas, claras, pilosas. O primeiro segmento duas e meia vezes maior que o segundo; o terceiro um pouco mais de duas e meia vezes o comprimento do quarto; este ultimo escuro, peludo, mais longo que a soma dos primeiros juntos.

Pronoto levemente convexo, com puntuações pouco distintas; tricarenado; as carenas altas, largamente uniareoladas. Vesicula medianamente desenvolvida, pouco lançada sobre a cabeça e com algumas nervuras marrons. Paranotos largos, elevados para cima, trisseriado em quasi toda sua extensão, porem bisseriado atraz.

Élitros alongados, mais ou menos estreitados; area costal bi, tri e depois quadrisseriada; subcostal largamente bisseriada; discoidal quadrisseriada na sua maior largura, excavada, manchada de escuro em sua metade.

Fi. 3 - *Leptopharsa livida* MONTE, n. sp.

As carenas, as margens dos paranotos, a nervura externa da area costal, as nervuras que limitam a discoidal da subcostal, espinhosas.

Patas claras com tibias escuras.

Comprimento 2,43 mm; largura 1,08 mm.

Holótipo (macho) e um parátipo colhido pelo Dr. P. WYGODZINSKY, em Viçosa, Minas Gerais, setembro 1943. O holótipo está

depositado na coleção do Instituto de Experimentação Agricola, Rio de Janeiro, e o parátipo na coleção do autor.

Perfeitamente distinta de qualquer espécie até o momento descrita. A espécie que mais se lhe aproxima é *L. cognata* D. & H.

Leptopharsa pallens, n. sp.

Cabeça escura fortemente convexa em cima; espinho mediano e o par posterior, muito longos, eretos, amarelados, apoiando-se o mediano com sua extremidade apical no par posterior; o par anterior muito curto, afilado e repoisando na superficie da cabeça. Olhos escuros e mui salientes. Bucula alta e profunda, escurecida na frente e amarelada posteriormente. Abertura rostral rasa e alargada. Rostro amarelado, com a extremidade escurecida e estendendo-se ao meio do metasterno. Antenas longas e amareladas. O primeiro segmento muito longo, tres vezes maior que o segundo; o terceiro bastante longo e tres vezes mais longo que o primeiro; o quarto, ausente.

Pronoto escuro, bastante convexo, com punturas delicadas e muito próximas, coberto de leve secreção esbranquiçada; a porção triangular amarelada e largamente reticulada; carenas foliaceas, cada uma composta de uma larga carreira de areolas; as laterais paralelas e um pouco mais baixas que a mediana; esta é levemente arqueada na sua parte anterior e muito alta na parte correspondente à porção triangular.

Vesicula muito alta, formando uma pequena crista na parte superior, truncada na frente e não se lançando sobre a cabeça.

Paranotos largos, fortemente levantados, na maior parte bisseriado, em alguns lugares trisseriados, as margens arredondadas e ligeiramente serreadas.

Élitros muito largos, alargando-se posteriormente, as extremidades separadas; area costal muito larga, com seis areolas na sua maior largura, tres perto da base e com duas fortes nervuras transversais na metade anterior; area subcostal larga, escura e trisseriada; area discoidal larga, com cinco carreiras de areolas na sua maior largura, escura, não alcançando a metade dos élitros. Na parte terminal dos élitros, uma linha curva e sulcada.

Patas relativamente longas, amareladas e tarsos escuros.

Comprimento 4,00 mm; largura 2,27 mm.

Holótipo (femea) colhido pelo sr. P. PAPRZYCKI em Satipo, Dep. Junin, Perú, agosto 1943.

Proxima de *L. farameae* D. & H., diferindo pela vesicula e carenas mais altas, pela area subcostal mais alargada, e primeiro segmento antenal muito mais desenvolvido.

Leptopharsa variegata, n. sp.

Cabeça pequena, escura, com cinco espinhos claros e afilados; o par anterior muito curto e o posterior um pouco mais longo, porem totalmente deitado sobre a superficie da cabeça; o espinho mediano, bem mais longo que os outros, castanho, ereto e dirigido para frente, não alcançando a metade do primeiro segmento antenal.

Antenas longas, amareladas, exceção dos 2/3 apicais do quarto segmento, que são escuros. O primeiro segmento duas vezes maior que o segundo; o terceiro ligeiramente maior que duas vezes e meia o comprimento do quarto; este ultimo, com os 2/3 apicais, escuros.

Pronoto escuro, convexo, com leve punturação e a porção triangular, clara; tricarenado; as carenas pouco elevadas, formadas de largas areolas e separadas cada uma das areolas, por nervuras escuras; as laterais um pouco afastadas na parte anterior, dirigindo-se para os paranotos, dos quais muito se aproximam.

Vesicula bem alta, porem pequena e largamente areolada.

Paranotos arredondados, largos, erguidos e indistintamente serreados nas margens; trisseriado na frente e bisseriado atraz (dois parátipos os possuem totalmente bisseriados).

Élitros longos, alargando-se para o apice, com as nervuras da metade apical, escura; area costal larga, serreadas nas margens, quasi totalmente quadrisseriada, mas trisseriadas na frente, e formada de celulas dispostas irregularmente, de maneira a apresentar as seguintes variações nos parátipos: 3,4,5,4 — 3,4,5,5,4 — 3,4,6,5,4; area subcostal estreita e bisseriada; discoidal muito curta e estreita, excavada e formada de celulas mui pequenas, com 4 carreiras de areolas na sua maior largura; area sutural muito larga, fusca e com uma carreira de celulas largas e salientes.

Bucula alta e escura; abertura rostral profunda e muito larga; rostro amarelado e curto.

Parte inferior do corpo amarelada e a pleural escurecida. Patas longas e amareladas.

Comprimento 2,84 mm; largura 1,32 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (femea) e oito parátipos colhidos pelo autor em julho e novembro, em S. Paulo (Capital).

Semelhante à *L. fortis* D. & H., porem bem menor e mais estreita; os paranotos muito mais estreitados; subcostal e carenas, mais baixas.

Teleonemia angustata, n. sp.

Cabeça escura, larga, com cinco espinhos amarelados; os anteriores muito curtos e dirigidos para frente; o mediano curto, curvado para baixo e com a extremidade encostada aos anteriores; os posteriores longos, deitados na superficie da cabeça e com as extremidades passando alem da base do mediano.

Antenas grossas, castanho-claras, peludas, mais ou menos curtas, o primeiro segmento ligeiramente maior que o segundo; o terceiro com o apice engrossado, pouco mais de duas vezes o comprimento do quarto; este ultimo escuro, uma vez e meia maior que a soma dos dois primeiros, e coberto de abundantes pêlos.

Búcula larga, castanha na parte superior e clara na inferior.

Rostro ferrugineo, curto, alcançando um pouco alem da metade da abertura rostral, sendo esta bem profunda e limitada por nervuras grossas e claras.

Pronoto muito elevado, amarelado, um pouco mais escurecido no centro, coberto de minusculos pêlos dourados; fortemente pontuado; tricarenado; as carenas medianamente elevadas, claras, grossas, escuras na parte discal, unisseriada, as aréolas muito pequenas; as laterais levemente estreitadas alem da sua metade; a porção triangular bem desenvolvida, formada de celulas largas. Paranotos

ligados à superficie do pronoto, ligeiramente afastados na parte correspondente ao colo, e, vistos externamente, uniareolados, alargando-se as aréolas pouco a pouco, de traz para frente.

Vesicula nula, apenas indicada pela elevação do colo em sua metade.

Élitros muito longos, estreitados, ligeiramente alargados para a parte apical; area costal muito estreita, uniareolada, as aréolas estreitas e longas, com manchas escuras; esta area é dirigida para cima na sua parte anterior, fazendo com que suas aréolas sejam muito estreitadas nesta parte; subcostal extremamente estreita, unisseriada; area discoidal muito longa, apertada para o apice e base, formada por largas celulas, por sua vez limitadas por grossas nervuras, muitas delas escuras e tendo cinco carreiras de aréolas na sua maior largura; sutural escura, com as celulas do apice claras, formando uma espécie de mancha branca.

Patas ferrugineas.

Comprimento 3,91 mm; largura 0,95 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (femea) e um parátipo colhido pelo autor em Belo Horizonte, Minas Gerais, em uma mirtacea, em 11-II-1937.

Proxima de *T. multimaculata* MONTE, mas dela se distinguindo pelas antenas maiores e mais delgadas, pela area costal muito estreita e pelas carenas mais altas.

Teleonemia bierigi, n. sp.

Alongada, fusco-amarelada; antenas e patas ferrugineas. Cabeça escura, com os espinhos anteriores engrossados e dirigidos para dentro, com suas extremidades tocando-se; o mediano muito grosso, em forma de tuberculo; os posteriores mais afilados do que os outros, alcançando um pouco alem da base do espinho mediano. As antenas muito grossas, peludas especialmente nos 3.º e 4.º segmentos. O primeiro segmento ligeiramente mais grosso e maior do que o segundo; o terceiro tres vezes maior do que o quarto.

Pronoto convexo, grosseiramente pontuado; a porção triangular largamente areolada; tricarenado; as carenas laterais mais aproximadas sobre o dorso e baixas, grossas e indistintamente areoladas.

Vesicula pouco desenvolvida, ligeiramente mais longa do que alta e pouco lançada sobre a cabeça.

Paranotos muito estreitados, a metade anterior mais larga do que a posterior, que se acha ligada ao pronoto.

Élitros alongados, mais engrossados no meio, formado de celulas largas e nervuras grossas e brilhantes; area costal erguida e estreitamente unisseriada, na metade anterior, cujas celulas se alargam bastante para a metade posterior; subcostal bisseriada, com celulas pequenas, e escurecida no meio, e unisseriada na parte correspondente às celulas mais largas da costal; area discoidal limitada por nervuras grossas e salientes e com cinco carreiras de areolas na sua maior largura. Toda area sutural composta de areolas foscas.

Comprimento 4,00 mm; largura 1,35 mm.

Holótipo (macho) colhido em La Perla, Costa Rica, em 24-V-1941 pelo Dr. A. BIERIG, a quem dedicamos o nome da espécie em homena-

gem ao estudioso especialista de Estafilinideos, que nos tem proporcionado excelente material de estudos da fauna costariquense.

Parece-me mais proxima de *T. picta* CHAMPION, mas dela se distinguindo pelo formato dos élitros, pelo numero de areolas das areas costal e subcostal e pelo formato da vesicula.

Teleonemia bondari, n. sp.

Alongada, estreitada, escuro-ferruginea, brilhante, com a vesicula, porção triangular e area costal, amarelados.

Cabeça escura, com cinco espinhos grossos e ferrugineos; o par da frente muito curto e cruzando-se os espinhos; o espinho mediano, mais grosso que os outros, curvo e repoisando sobre o par anterior; o par de traz, alongado, alcançando um pouco alem da metade do espinho mediano.

Antenas longas, ferrugineas, salvo a metade apical do ultimo segmento, curtamente pilosas; o primeiro segmento curto, mais grosso e um pouco mais longo do que o segundo; o terceiro tres vezes e meia mais longo do que o quarto; este ultimo bem maior que a soma dos dois primeiros.

Rostro longo, extendendo-se um pouco alem do mesoesterno.

Pronoto bastante convexo, grosseiramente punturado, as celulas da porção triangular muito largas; tricarenado; as carenas unisseriadas, as laterais dirigindo-se para fora e passando alem da base da vesicula.

Vesicula mais ou menos elevada, formada de celulas bem largas e com a extremidade dirigida para frente e lançada sobre a cabeça.

Paranotos muito estreitos, quasi totalmente ligados ao pronoto.

Elitros alongados, escurecidos, formado de nervuras grossas e brilhantes; área costal com a parte anterior unisseriada e ligeiramente dirigida para cima, a parte posterior uni-bisseriada, com celulas largas e quadrangulares; area subcostal largamente bisseriada; area discoidal levemente deprimida, limitada por nervuras grossas, especialmente a que se limita com a subcostal, com celulas largas e quatro carreiras de areolas na sua maior largura; area sutural fosca, com algumas de suas celulas hialinas.

Patas longas e ferrugineas.

Comprimento 4,00 mm; largura 1,35 mm.

Holótipo (macho), Belo Horizonte, Minas Gerais, em 5-III-1937, colhido pelo autor.

A área costal bisseriada; a carena mediana, não elevada, separa-a de *Teleonemia ochracea* CHAMPION.

O nome da espécie é uma homenagem ao Dr. GREGORIO BONDAR, pelos inestimaveis serviços que tem prestado à entomologia brasileira.

Leptodictya faceta, n. sp.

Colorido amarelo-palha, porem a metade terminal dos elitros interessando as areas costal e subcostal, levemente enfuscadas; o pronoto castanho.

Cabeça escura com cinco longos e enfuscados espinhos, os quais se apresentam claros na base; o par anterior um pouco mais longo que o 1.º segmento ante-

nal. Antenas não muito longas, os tres primeiros segmentos marrons, o quarto, escuro. O alótipo tem o terceiro segmento antenal amarelado. O primeiro segmento, do dobro do segundo; o terceiro, tres vezes o comprimento do quarto.

Rostro curto, amarelado e com a extremidade escura; abertura rostral profunda.

Pronoto levemente convexo, tricarenado; carenas laterais baixas e paralelas, unisseriadas, as areolas pequenas; a mediana da mesma altura que as laterais, somente um pouco mais elevada junto à vesicula.

Vesicula medianamente desenvolvida, ponteaguda e não lançada sobre a cabeça.

Paranotos largos, a porção dobrada bisseriada, côncava e tendo a parte anterior quasi ligada às carenas laterais.

Élitros largos, as nervuras da metade apical levemente enfuscadas; area costal muito larga, formada de areolas largas e quinquesseriada na sua maior largura; area subcostal muito estreita, bisseriada; area discoidal larga, extendendo-se até a metade dos élitros e com seis carreiras de areolas na sua parte mais larga.

Comprimento 3,18 mm; largura 1,59 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (femea), fazenda das Palmeiras, Ipaussú, S. Paulo, 24-VI-1942, colhidos pelo autor sobre uma graminea.

Semelhante à *L. dola* D. & H., distinguindo-se pelas carenas e vesicula menores e pela ausência de nervuras na metade distal.

Leptodictya tegeticula, n. sp.

Muito larga e totalmente amarelo-palha, o pronoto acastanhado e com forte exudação esbranquiçada na cabeça.

Cabeça provida de cinco espinhos amarelados, sendo o par anterior muito afilado e curto e dirigido para frente; o mediano muito longo, igualando-se ao apice do segundo segmento antenal, dirigido para cima e ligeiramente encurvado; o par posterior muito longo, curvo e dirigido para fora.

Antenas longas, amareladas, levemente coberta de pêlos; o primeiro segmento o dobro do segundo; o terceiro tres vezes e meia maior que o quarto; este ultimo com a metade basal enfuscada e a apical, escura.

Rostro longo alcançando o terceiro par de patas; abertura rostral medianamente larga.

Bucula profunda.

Pronoto levemente convexo, acastanhado, com pouca exudação, tricarenado; as carenas bem altas, largamente uniareoladas, as laterais paralelas, a mediana um pouco mais elevada junto à vesicula.

Vesicula bem desenvolvida, muito afilada na ponta, os seus lados caindo como em um telhado e não lançada sobre a cabeça.

Paranotos largos, erguidos, a parte dobrada largamente bisseriada.

Élitros muito largos, com os apices separados; area costal irregularmente formada de 4, 5 ou 6 areolas, sendo as que ficam junto à area subcostal, muito menores, e tendo tres distintas nervuras em sentido transversal; area subcostal muito estreita, bisseriada, tendo a carreira inferior de areolas muito menor que

a superior; area discoidal larga e longa, com sete carreiras de areolas na sua maior largura e alcançando a metade dos élitros.

Patas amareladas. Parte inferior do corpo, castanha.

Comprimento 3,83; largura 2,43 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (femea) e dois parátipos, S. Paulo (Capital), em março de 1942, colhido pelo autor em uma graminea.

Difere de *L. comitis* D. & H. pelos espinhos da cabeça, muito mais longos, pela vesicula maior e não comprimida e pela area costal mais larga. E' muito afim de *L. paspalii* D. & H., porem especie muito mais larga. Segundo a descrição original, *L. paspalii* tem a area subcostal unisseriada.

Leptodictya intermedia, n. sp.

Pouco desenvolvida e relativamente estreitada; amarelo-fusca.

Cabeça com cinco espinhos amarelos e longos; o par anterior ligeiramente mais curto que os outros, reto, dirigido para frente; o espinho mediano indo um pouco alem do primeiro segmento antenal; o par posterior dirigido para frente e para os lados.

Antenas curtas, castanho-ferrugineas, pilosas; o primeiro segmento ligeiramente maior que o segundo; o terceiro um pouco mais de duas vezes e meia o comprimento do quarto.

Rostro curto e amarelado. Bucula alta e escura.

Pronoto escuro; tricarenado; as carenas muito baixas, com uma carreira de areolas muito pequenas, quasi indistintas. Vesicula baixa, levemente ponteaguda. Paranotos bisseriados, mais largos na frente, a parte dobrada repoisando totalmente sobre o pronoto.

Élitros alongados, a metade posterior com areolas fuscas; area costal não muito larga, porem com 5-6 carreiras de areolas na sua maior largura, e dispostas irregularmente; area subcostal muito estreita, bisseriada; area discoidal muito alongada, alcançando a metade dos élitros, formada de pequenas areolas, cinco na sua parte mais larga.

Comprimento 3,29 mm; largura 1,59 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (femea) e cinco parátipos, Nova Teutonia, S. Catarina, FRITZ PLAUMANN, col., em 24-III-1938.

Semelhante a *L. lepida* (STAL), porem mais larga e maior.

AMERICAN TINGITIDAE (HEMIPTERA)

Abstract

The present paper contains the description of 10 new lace bugs and notes on other species of interest for studies of the American fauna. All the types are in the private collection of the author, except the type of Leptopharsa livida which is in the collection of the Instituto de Experimentação Agricola, Rio de Janeiro.

Vol. 14 — Art. 20 Dezembro de 1943

REVISÃO DAS ESPÉCIES DE "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" DA GALINHA E DO POMBO DOMÉSTICOS

POR

C. Pereira e W. F. de Almeida

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 29 figuras no texto

INTRODUÇÃO

A resolução dos problemas de nomenclatura dos tricômonas de animais domésticos é de importância fundamental para o progresso do estudo dos flagelados intestinais em geral, pois foi nesses animais que se realizaram não só as primeiras observações sobre o assunto como grande número de trabalhos posteriores, para só mais recentemente serem tais pesquisas estendidas aos animais silvestres.

Infelizmente, porém, a grande soma de trabalhos realizados, ao invés de facultar o esclarecimento progressivo do problema, contribuiu na sua maior porção para torná-lo realmente bastante obscuro, devido, em parte às deficiências de técnica inerentes aos primeiros pesquisadores e ainda frequentes em autores mais modernos, em outra parte à admissão da existência de uma especificidade, não demonstrada neste grupo de protozoários e, principalmente, a um pronunciado descaso pelos dados da literatura cientifíca, no que ela apresenta de realmente aproveitavel.

No que concerne aos tricômonas das aves, por exemplo, torna-se imprescindivel esclarecer a situação das espécies encontradas nas galinhas e nos pombos, que foram os primeiros materiais trabalhados, para somente então atacarmos a resolução das espécies encontradas nas outras aves domésticas e, finalmente, nas aves silvestres.

A literatura sobre os tricômonas de galinhas e pombos refere grande cópia de nomes, tais como: *Trichomonas gallinarum* (DAVAINE, 1875) *in* KRUSE (1896), *T. gallinae* (RIVOLTA, 1878), *T. hepatica* (RIVOLTA, 1878) NIESCHULZ e BOS, 1936, *T. eberthi* (KENT, 1880), *T. columbae* RIVOLTA *in* RAILLIET (1885), *T. columbae* RAILLIET *in* NEUMANN (1888), *T. columbarum* KRUSE, 1896, *T. columbarum* PROWAZEK e ARAGÃO, 1909 *in* NIESCHULZ e BOS (1936), *Chilomastix gallinarum* MARTIN e ROBERTSON, 1911, *Trichomonas gallinarum* MARTIN e ROBERTSON, 1911, *T. eberthi* MARTIN e ROBERTSON, 1911, *Trichomastix gallinarum* MARTIN e ROBERTSON, 1911, *Haemotrichomonas gallinarum* MARTOGLIO, 1917, *H. columbae* MARTOGLIO, 1917 *in* LANFRANCHI (1917), *Trichomonas pullorum* WEINZIRL, 1917, *T. diversa* VOLKMAR, 1930, *T.*

halli YAKIMOFF, 1934, *Pentatrichomonas* sp. ALLEN, 1936 e *Trichomonas gallinarum* MARTIN e ROBERTSON, 1911 *in* ALLEN (1940).

Para o correto enunciado do problema é indispensavel fazermos um apanhado histórico-crítico da bibliografia referente à sistemática e nomenclatura dos tricômonas que teem sido encontrados na galinha e no pombo domésticos.

ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA

EBERTH (1861), refere o achado de "ein kleines Infusorium" no céco e no íleo de algumas aves, tais como galinhas, perdizes, patos e gansos. O gênero *Saenolophus* LEUCKART (1863) é erigido para conter os flagelados vistos por EBERTH. DAVAINE, depois de ter mantido uma perdiz em cativeiro, durante oito dias, alimentada a pão e aveia, veiu a encontrar no seu céco um flagelado a que denominou *Cercomonas gallinarum* DAVAINE, 1875 (1). STEIN (1878), ao tratar dos flagelados vistos por EBERTH, admite a superfluidade do gênero para eles criado por LEUCKART, por achar que cabem perfeitamente no gênero *Trichomonas* DONNÉ, 1836.

Graças às investigações bibliográficas de STABLER (1938), ficou bem estabelecido que *Cercomonas gallinae* RIVOLTA, 1878, foi a designação dada aos numerosos "infusórios" associados a um processo difteroide, de coloração amarelada, abrangendo a boca, o esôfago e o englúvio do pombo; no mesmo trabalho foi referido um processo caseoso da porção anterior do aparelho digestivo de pintos, no qual não foi assinalada a presença de protozoários; num trabalho seguinte, que trata da hepatite caseosa dos pombos, é registrado como *Cercomonas hepaticum* RIVOLTA, 1878, um flagelado que foi encontrado em relação com o processo mórbido.

LEUCKART (1879), não refere mais seu gênero *Saenolophus*, admitindo, com STEIN, a possibilidade de que os protozoários de EBERTH sejam realmente tricômonas. RIVOLTA e DELPRATO (1880) pouco acrescentaram ao trabalho anterior de RIVOLTA, a não ser a admissão de que *Cercomonas gallinae* fosse também responsavel por estomatites, esofagites e engluvites nos pintos ("giovani polli"). *Trypanosoma eberthi* KENT, 1880, foi a primeira designação nos moldes da nomenclatura binária, aplicada aos protozoários vistos inicialmente por EBERTH, embora na suposição de que tais organismos fizessem parte do

(1) TRAVIS (1936) teve a oportunidade de descrever, do céco de *Perdix perdix perdix* (L.), não só o *Trichomonas (Tr.) hegneri* TRAVIS, 1936, que foi assinalado também em *Lophortyx californica californica* SHAW, como ainda a subespécie *Trichomonas (Tr.) floridanae perdicis* TRAVIS, 1936, sem levar em consideração o *Cercomonas gallinarum* DAVAINE, 1875, que, como veremos depois, sofreu grande distorsão quanto ao hospedeiro, que passou a ser considerado como galinha doméstica, e não a perdiz, como fôra claramente estabelecido pelo seu autor. Impõe-se portanto a repetição da experiência de DAVAINE, como tentativa para verificar se é a espécie ou a subespécie de TRAVIS que deve cair na sinonímia de *Trichomonas gallinarum* (DAVAINE, 1875).

ciclo evolutivo dos verdadeiros tripanosomas ou, mesmo, não passassem de espermatozoides de anfíbios devorados por frangos dágua.

RAILLIET (1885) (2) denominou *Lophomonas columbae* RIVOLTA a flagelados encontrados no intestino de pombos. NEUMANN (1888) atribue *Cercomonas gallinae* e *C. hepaticum* a RIVOLTA, 1881, o que é incorreto, e cita KUENSTLER, sem indicação de data, como o autor que teria estabelecido definitivamente a natureza de tricômonas para os flagelados de EBERTH, o que não nos foi possivel confirmar, pois não encontramos nos trabalhos de KUENSTLER o que lhe atribuira NEUMANN; por conseguinte, parece-nos realmente ser este último autor o primeiro a, dentro da nomenclatura binária, registrar certo o nome da primeira espécie de tricômonas de ave doméstica: *Trichomonas eberthi* (KENT, 1880). Refere NEUMANN também o *Lophomonas columbae* RAILLIET; a este propósito, é interessante assinalar que parece ser RAILLIET o ponto de partida para a lamentavel confusão estabelecida em relação ao autor do nome específico *columbae:* RAILLIET (1885) atribuiu-o a RIVOLTA, porem sem indicar data; STABLER (1938) demonstrou que tal designação específica não consta dos trabalhos de RIVOLTA (1878), pelo que deixou aberta a possibilidade de se encontrar ela em RIVOLTA & DELPRATO (1880), obra que não pôde consultar; nós tambem não conseguimos manusear "L'Ornitojatria", porem, graças ao nosso colega J. REIS que a teve por algum tempo em mãos e dela extraiu notas fieis relativas ao assunto, pondo-as gentilmente à nossa disposição, o que muito agradecemos, foi-nos possivel verificar, indiretamente, que o livro de 1880 pouco acrescentou aos trabalhos de RIVOLTA (1878), não contendo a menor referência a qualquer protozoário intestinal de pombo cujo nome específico fosse *columbae;* portanto, a primeira citação de *columbae* parece estar contida em RAILLIET (1885), mas atribuida por este autor, certo ou errado, a RIVOLTA, sem indicação de data. Achamos preferivel assumir uma atitude conservadora, respeitando a designação feita por RAILLIET e novamente mantida em 1893, apesar da aparente tentativa de correção por parte de NEUMANN (1888 e 1892).

KRUSE (1896) foi triplamente inexato: uma vez por afirmar que DAVAINE encontrara seu *Cercomonas gallinarum* no exsudato de difteria de galinha; outra por atribuir sua descrição a RIVOLTA; e, finalmente, por denominá-lo *Trichomonas columbarum.* PERRONCITO (1901 ?) incidiu nos dois primeiros erros de KRUSE. DOFLEIN (1901)

(2) Não tivemos a oportunidade de consultar a primeira edição do livro de RAILLIET (1885); portanto, fomos obrigados a tirar as conclusões a que chegamos pelos seguintes caminhos indiretos, que reconhecemos serem pouco seguros, mas que foram os únicos à nossa disposição: a) as afirmações dos livros de NEUMANN (1888 e 1892), atribuindo a RAILLIET o nome *columbae;* b) a afirmação de RAILLIET (1893) de que anteriormente incluira o flagelado do intestino do pombo no gênero *Lophomonas;* c) o fato de não encontrarmos nos outros trabalhos de RAILLIET referências ao assunto em questão; d) os apontamentos de J. REIS, que consultou "L'Ornitojatria" e aí não encontrou nenhuma referência a *columbae.*

errou apenas no hospedeiro, registrando: "*Cercomonas gallinarum* DAVAINE 5,1 μ lang, 5 μ breit, im Darm von Huehnern", quando perdizes em alemão são "Rebhuehner" *(sensu strictu)* e "Feldhuehner" *(sensu latu)*, o que provavelmente serviu para aumentar ainda mais a confusão lançada sobre a espécie de DAVAINE !

Alem disso, DOFLEIN registra o *Trypanosoma eberthi* KENT como o iria fazer ainda NEVEU-LEMAIRE (1912), do que discorda LUEHE (1906), denominando-o *Spirochaeta eberthi* (KENT, 1880), apesar de LAVERAN & MESNIL (1901) terem confirmado os pontos de vista de STEIN (1878), LEUCKART (1879), NEUMANN (1888, 1892) e RAILLIET (1893), sobre a denominação genérica dos flagelados de EBERTH!

PROWAZEK & ARAGÃO (1909) encontraram em regiões amarelo-citrinas da mucosa bucal de pombos um tricômonas com quatro flagelos, raramente com três, a que denominaram *Trichomonas columbarum*, sem indicação de autor e data, o que deixou em dúvida sobre tratar-se do nome dado por KRUSE (1896) ou de ser um nome novo e portanto homonímico com o de KRUSE, como foi interpretado por NIESCHULZ & BOS (1936). MARTIN & ROBERTSON (1909) estudam os flagelados intestinais de galinha, reconhecendo uma forma *A*, como tripanosoma "condition", uma forma *B*, como tricômonas "condition", uma forma *C*, como monocercomonas "condition" e uma forma *D*, como "a sharply marked type", além de admitir formas de passagem.

Com MARTIN & ROBERTSON (1911) inaugura-se um período mais interessante do ponto de vista técnico, embora os autores não respeitassem a lei da prioridade, considerando como espécies novas um *Chilomastix gallinarum* MARTIN & ROBERTSON, 1911, um *Trichomonas gallinarum* MARTIN & ROBERTSON, 1911, com quatro flagelos anteriores, um *T. eberthi* MARTIN & ROBERTSON, 1911, com três flagelos livres e ainda um *Trichomastix gallinarum* MARTIN & ROBERTSON, 1911, com quatro flagelos livres, cujas ilustrações tornaram-se clássicas.

FONSECA (1915) criou para o *Chilomastix gallinarum* MARTIN e ROBERTSON o sub-gênero *Tetrachilomastix*, por analogia com *Tetratrichomonas* ALEXEIEFF, 1911 e com *Tetratrichomastix* MACKINNON, 1915, baseado na descrição original da espécie; mantém seu sub-gênero em 1916, elevando-o posteriormente à categoria de gênero: *Tetrachilomastix* FONSECA, 1920, tendo como espécie-tipo *T. gallinarum* (MARTIN e ROBERTSON, 1911), embora um erro tipográfico indique o ano de 1914. WENYON (1926) estabeleceu sua sinonímia com *Chilomastix* ALEXEIEFF, 1910. Como as figuras publicadas por MARTIN e ROBERTSON (1911) representam aspectos que notamos frequentemente em *Trichomonas eberthi*, achamos conveniente considerar o *Chilomastix gallinarum* MARTIN e ROBERTSON, 1911 sinônimo de *Trichomonas*

eberthi (KENT, 1880), com o que deixa de existir a espécie-tipo do gênero *Tetrachilomastix*, o que independe da existência real de representantes do gênero *Chilomastix* em galinhas, assunto de que trataremos oportunamente.

Haemotrichomonas gallinarum MARTOGLIO, 1917, com 5 flagelos livres foi descrito do sangue de galinhas, ao passo que um flagelado obtido do sangue de pombo e mal estudado por LANFRANCHI (1908), foi por este autor denominado em nota publicada em 1917 *H. columbae* MARTOGLIO, 1917! WEINZIRL (1917) estuda um tricômonas do céco de galinhas, que ele caracteriza mal, denominando-o *Trichomonas pullorum* WEINZIRL, 1917. O *Trichomonas diversa* VOLKMAR, 1930, considerado como tendo três flagelos livres, foi descrito da porção superior do tubo digestivo do perú; mais tarde, STABLER (1938) considerou-o igual ao encontrado na boca dos pombos. YAKIMOFF, julgando tratar-se da primeira verificação de tricomonose bucal num galo, criou a espécie *Trichomonas halli* YAKIMOFF, 1934.

ALLEN (1936) referiu uma espécie indeterminada de *Pentatrichomonas* no intestino de galinha, que, em outro trabalho de 1940, foi considerado idêntico ao *Trichomonas gallinarum* MARTIN & ROBERTSON, 1911; assinala sua presença tambem nos perús e estabelece como sua sinonímia o *T. pullorum* WEINZIRL, 1917.

NIESCHULZ & BOS (1936) estabeleceram erroneamente a prioridade do nome *Trichomonas hepatica* (RIVOLTA, 1878) para a espécie da boca e do fígado do pombo.

SCHAAF & SCHERLE (1938) verificaram a existência de dois tipos de tricômonas na galinha: o do intestino anterior, com quatro flagelos livres, e o do intestino posterior com três flagelos livres, sem se preocuparem com a sua nomenclatura.

KOFOID (1939) admitiu que o *Trichomastix gallinarum* MARTIN & ROBERTSON, 1911, fosse idêntico ao *Trichomonas eberthi*, pela inexistência do gênero *Eutrichomastix*. TANABE (1926) já não havia conseguido encontrar o *T. gallinarum*, mas sim o *T. eberthi*.

STABLER (1941) faz um bom estudo morfológico do tricômonas da boca do pombo, denominando-o acertadamente *Trichomonas gallinae* (RIVOLTA, 1878).

Ora, como os dados da literatura não fornecessem os elementos necessários para esclarecer o intrincado cipoal em que se havia transformado o problema da nomenclatura dos tricômonas de galinha e de pombo, tomamos a resolução de investigar cuidadosamente tais protozoários nos dois hospedeiros em questão, sem nos preocuparmos com a sua nomenclatura, o que nos levou a concluir pela existência, em São

Paulo, de uma espécie de tricômonas comum à boca das galinhas e dos pombos e possuidora de quatro flagelos livres; uma segunda espécie, do intestino de galinha, com 5 flagelos livres, e mais uma terceira espécie, do intestino do pombo, tendo apenas três flagelos livres. Esperamos durante três anos, inutilmente, o aparecimento da espécie com tres flagelos, do intestino de galinha, que MARTIN & ROBERTSON descreveram como *T. eberthi*, até nos convencermos da sua inexistência, como ALLEN (1940) já havia estabelecido.

Outro problema sério foi a denominação da espécie existente no intestino do pombo, pois o conceito de *columbae* dos autores coincidia geralmente com o de *gallinae*, este bem estabelecido por STABLER (1938), de modo que fomos obrigados a considerá-la provisoriamente pelo periodo de dois anos, como espécie ainda não descrita, até que conseguimos deslindar a confusão estabelecida em torno de *columbae*, atribuindo-a finalmente a RIVOLTA *in* RAILLIET (1885).

A revisão bibliográfica do assunto, de acordo com os elementos de que dispusemos, articulada com o estudo dos tricômonas que nos foi possivel encontrar nas galinhas e nos pombos de São Paulo, levaram-nos a considerar como válidas as seguintes espécies de tais flagelados, cujas descrições e sinonímia daremos a seguir:

Trichomonas (Trichomonas) gallinae (RIVOLTA, 1878) na porção anterior do tubo digestivo de galinhas e pombos;

Trichomonas (Pentatrichomonas) eberthi (KENT, 1880), do intestino de galinhas;

Trichomonas (Tritrichomonas) columbae (RIVOLTA *in* RAILLIET, 1885), do intestino de pombos.

REDESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

O estudo do material foi realizado de acordo com a técnica e a concepção de morfologia dos tricômonas que foram expostas em PEREIRA e ALMEIDA (1940 e 1943), sensivelmente diversas do procedimento habitual.

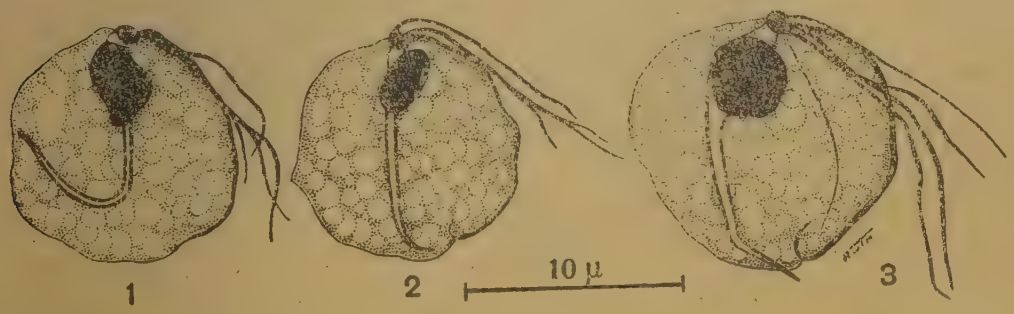
Trichomonas (Trichomonas) gallinae (RIVOLTA, 1878).

(Figuras 1-3)

Sin.: *Cercomonas gallinae* RIVOLTA, 1878.
Cercomonas hepaticum RIVOLTA, 1878.
Trichomonas columbarum KRUSE, 1896.
Trichomonas columbarum PROWAZEK & ARAGÃO, 1909.
Trichomonas columbae GOEDELST, 1911 (pro-parte).
Haemotrichomonas columbae MARTOGLIO, 1917 *in* LANFRANCHI (1917).
Trichomonas diversa VOLKMAR, 1930.
Trichomonas columbae RIVOLTA *in* TRAVIS (1932).

Trichomonas halli YAKIMOFF, 1934.
Trichomonas hepatica (RIV., 1878) NIESCHULZ e BOS, 1936.
Trichomonas columbae (RIV.) *in* CAUTHEN (1936).
Trichomonas columbae (RIV.) *in* SCHAAF e SCHMITT (1937).
Trichomonas columbae (RIV.) *in* CALLENDER e SIMMONS (1937).
Trichomonas columbae (RIV.) *in* STABLER (1938).
Trichomonas gallinae (RIVOLTA, 1878) STABLER, 1938.

Forma — Os indivíduos flagelados apresentam-se elipsoides, ovoides, piriformes ou mesmo arredondados, quando vistos a fresco. O axostilo pode apresentar-se saliente ou não, conforme se trate de formas senescentes ou jovens. Por vezes são também encontradas formas ameboides, quer em material proveniente diretamente do hospedeiro, quer em culturas novas. A forma dos exemplares fixados e corados é muito variavel.



Figs. 1-3: *Trichomonas (Trichomonas) gallinae* (RIVOLTA, 1878).

Dimensões — As medidas foram tomadas sempre em exemplares obtidos de cultura, fixados em esfregaços a seco, refixados pelo metanol e corados pelo May-Gruenwald-Giemsa. O comprimento dos exemplares foi determinado pela medida do segmento compreendido entre o blefaroplasto e o polo oposto, sempre com exclusão da porção livre do axostilo, quando existente. A média dos comprimentos de 50 exemplares foi de 11,2µ, com o mínimo de 7,0µ e máximo de 15,0µ. A largura média de 50 exemplares foi de 10,8µ, com o mínimo de 4,7µ e o máximo de 15,0µ.

Aparelho cinético — Ha vários grânulos blefaroplásticos conglomerados, dando a impressão superficial de um único. Destes grânulos partem os quatro flagelos livres, a fibra marginal da membrana ondulante, a fibra costal e as fibras do axostilo. Ha quatro flagelos dirigidos para a frente, com o comprimento progressivamente decrescente, sendo o maior deles aproximadamente do mesmo comprimento do corpo do tricômonas, ou mesmo ligeiramente maior. A membrana ondulante vai até às proximidades da

extremidade do corpo oposta ao blefaroplasto; sua fibra marginal termina com ela, sem se tornar um flagelo livre. A fibra costal percorre o interior do corpo do tricômonas a meia distância entre a membrana ondulante e o núcleo, tendo um comprimento de cerca de 5/6 do da membrana ondulante. O axostilo parte do blefaroplasto, percorre a parte central do corpo do protozoário, terminando junto à periferia ou fazendo saliência para o exterior; apresenta-se frequentemente encurvado na sua parte média ou no terço posterior; sua porção anterior, juxtanuclear, ou "capitulum", é mais larga e cora-se menos intensamente; suas margens coram-se mais intensamente do que a porção medular.

Núcleo — Situado na porção anterior do corpo, pode ser esférico, elipsoide ou ovoide. E' constituido por numerosos blocos de cromatina juxtapostos.

Divisão — STABLER (1941) estudou o processo de multiplicação do *T. (Tr.) gallinae*, que em suas linhas gerais é semelhante ao que descreveremos adiante para o *T. (Tritr.) columbae*, estimando em 6 o número de cromossômios da espécie com que trabalhou.

Habitat — Porção pregástrica do tubo digestivo e fígado.

Hospedeiros — *Columba livia domestica* L., *Gallus gallus* L., *Meleagris gallopavo* L., *Falco sparverius sparverius* L., *Buteo lineatus lineatus* (GMELIN), *Streptopelia risoria* (L.), *Zenaidura macroura carolinensis* (L.), *Munia oryzivora* (L.), *Brotogeris jugularis* (MUELLER) e *Leptotila verrauxi verrauxi* (BONAPARTE).

Distribuição geográfica — Cosmopolita.

Cultivabilidade — Cultiva-se facilmente no meio líquido soro-salino-citratado de Cleveland, modificado por ALMEIDA *in* CUOCOLO (1942), mantendo-se melhor em ampolas fechadas a lâmpada do que nos tubos de ensáio embuchados com algodão. A primeira cultura a partir do hospedeiro deve ser mantida a 37°C, ao passo que depois de algumas repicagens o protozoário passa a suportar muito bem a temperatura ambiente, com a vantagem de permitir um espacejamento maior entre as repicagens, que eram feitas semanalmente. Esta espécie já havia sido cultivada anteriormente no meio L. E. S. de BOECK e DRBOHLAV (1925) por BOS (1932 e 1933), CAUTHEN e HARRIS (1935) e, nesse meio, mas com modificações, por WALLER (1934), MIESSNER e HANSEN (1936), SCHAAF e SCHMITT (1937), e LEVINE, BOLEY e HESTER (1941); em caldo de fígado por BOS (1934) e NIESCHULZ e BOS (1936), e em líquido de Ringer com 1% de sôro de Loeffler deshidratado, por CAUTHEN (1936).

Especificidade — *Trichomonas (Tr.) gallinae* provenientes de pombos foram inoculados com resultados positivos em perús por Bos (1934) e Stabler (1938), em pintos por Cauthen (1936), Niemeyer (1939) e Levine e Brandly (1940), em ratos por Rakoff (1934), em camondongos por Bos (1934) e Wittfogel (1935) e em cobaias por Bos (1934). O flagelado obtido de perús foi transferido com êxito para pintos, galinhas e pombos por Hawn (1937). O de pintos foi instalado em pombos por Levine e Brandly (1939), em perús, em *Colinus virginianus virginianus* (L.), em canários e pardais, com alta porcentagem de insucessos em patos jovens por Levine, Boley e Hester (1941), ao passo que obtiveram resultados negativos em *Phasianus torquatus* Gmelin e em *Sturnus vulgaris* L.. Stabler e Shelanski (1936) inocularam o material de *Falco sparverius sparverius* L. em pombos, que se tornaram positivos e transmitiram a infecção a *Buteo lineatus lineatus* (Gmelin), alimentados com os seus cadáveres; estes fatos foram confirmados em aves de rapina por Stabler (1938). Callender e Simmons (1937) transmitiram o flagelado de *Munia oryzivora* (L.) ao *Brotogeris jugularis* (Mueller) e à *Leptotila verrauxi verrauxi* (Bonaparte). Por outro lado, Cauthen (1936) não conseguiu infectar pintos com tricômonas de pombo, quando eram mantidos em dieta normal, ao passo que os resultados se tornavam positivos quando os pintos eram submetidos a uma ração de quirera de milho. Miessner e Hansen (1936) não conseguiram infectar camondongos por via oral com os tricômonas provenientes do pombo, o mesmo sucedendo a Gabaldon e Andrews (1935) em relação aos ratos jovens, quando inoculados intramuscularmente. Levine e Brandly (1940) mostraram diferenças de susceptibilidade ao tricômonas em lotes diversos de galinhas, mesmo em relação ao material originário de galinha, o que talvez permita explicar os resultados negativos obtidos por Waller (1934).

Trichomonas (Pentatrichomonas) eberthi (Kent, 1880).

(Figuras 4-10)

Sin.: "Ein kleines Infusorium" Eberth, 1861 *(nomen nudum)*.
Saenolophus "Eberth's" Leuckart, 1863 *(nomen nudum)*.
Trichomonas "von Jos. Eberth" Stein, 1878 *(nomen nudum)*.
Trichomonas "von Eberth" Leuckart, 1879 *(nomen nudum)*.
Trypanosoma eberthi Kent, 1880.
Trichomonas eberthi (Kent, 1880) Kuenstler *in* Neumann, 1888.
Trichomonas eberthi (Kent, 1880) *in* Railliet (1893).
Trypanosoma eberthi (Kent, 1880) *in* Doflein (1901).
Trichomonas eberthi (Kent, 1880) *in* Laveran e Mesnil (1901).
Spirochaeta eberthi (Kent, 1880) Luehe, 1906.

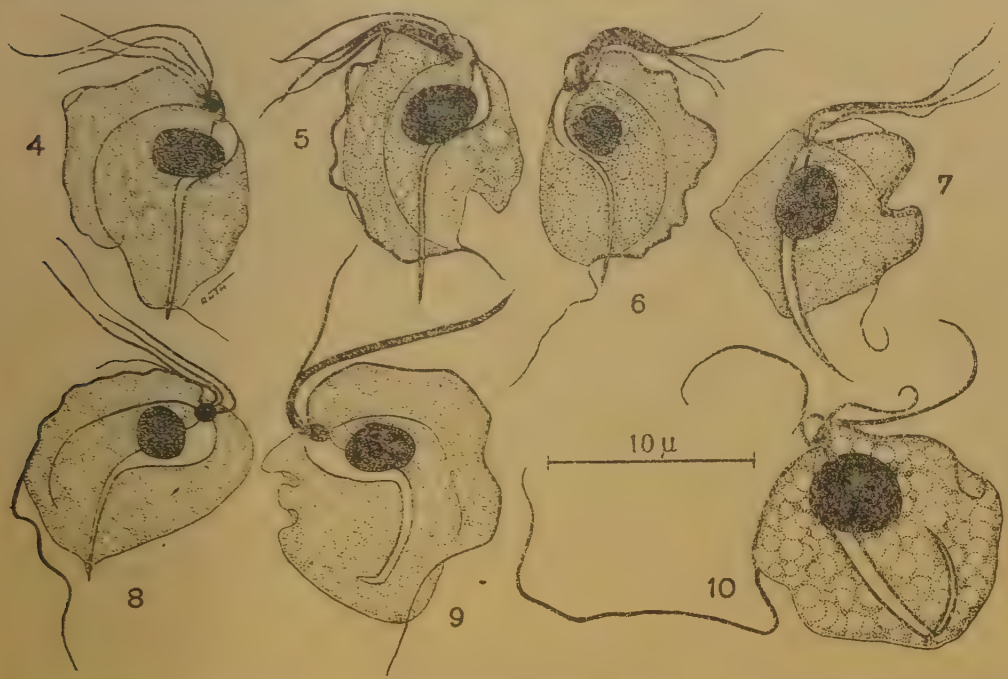
Chilomastix gallinarum MARTIN e ROBERTSON, 1911.
Trichomonas gallinarum MARTIN e ROBERTSON, 1911.
Trichomonas eberthi MARTIN e ROBERTSON, 1911.
Trichomastix gallinarum MARTIN e ROBERTSON, 1911.
Chilomastix (Tetrachilomastix) gallinarum (MARTIN e ROBERTSON, 1911) FONSECA, 1915.
Haemotrichomonas gallinarum MARTOGLIO, 1917.
Trichomonas pullorum WEINZIRL, 1917.
Tetrachilomastix gallinarum (MARTIN e ROBERTSON, 1911) FONSECA, 1920.
Pentatrichomonas sp. ALLEN, 1936.
Trichomonas gallinarum MARTIN e ROBERTSON, 1911 *in* ALLEN (1940).

Forma — Os indivíduos flagelados, vistos a fresco, apresentam-se piriformes, ovoides ou elipsoides; o material fixado e corado exibe grandes irregularidades de forma. Verificamos tambem a existência de formas ameboides e senescentes, quer em cultura quer no material proveniente do hospedeiro.

Dimensões — As medidas foram tomadas segundo o critério adotado para o *T. (Tr.) gallinae*. A média dos comprimentos de 50 exemplares foi de 10,2μ, com o mínimo de 7,0μ e o máximo de 13,0μ. A largura média de 50 exemplares foi de 8,3μ, com o mínimo de 4,3μ e máximo de 11,6μ.

Aparelho cinético — Os grânulos blefaroplásticos apresentam-se geralmente conglomerados; em alguns casos, entretanto, foi-nos possivel verificar a existência de até quatro grânulos, dos quais dois situados dorsalmente e dois ventralmente (figs. 4 e 5); os grânulos dorsais juxtapõe-se um atrás do outro, sendo o anterior cerca de três vezes mais volumoso do que o posterior; os grânulos ventrais constituem um agrupamento mais separado do grupo dorsal, dispõe-se um ao lado do outro, tendo ambos dimensões da mesma ordem de grandeza do grânulo dorsal posterior. Quanto à origem dos axonemas em relação aos grânulos blefaroplásticos, pareceu-nos ser a seguinte; do grânulo dorsal anterior originam-se quatro flagelos anteriores e as duas fibras marginais da membrana ondulante; do grânulo dorsal posterior parte a fibra costal; do grânulo ventral de situação mais próxima aos dorsais origina-se uma das fibras do axostilo, ao passo que o outro grânulo ventral seria o ponto de partida da outra fibra do axostilo e do quinto flagelo anterior. Ha cinco flagelos anteriores: os dois maiores são sub-iguais, com um comprimento sensivelmente igual ao comprimento do flagelado; outros dois, também sub-iguais, teem um comprimento que não vai além dos 3/4 do comprimento dos dois flagelos maiores; o quinto flagelo é de dimensões muito reduzidas, raramente indo alem de 1 a 2μ. Em esfregaços feitos

com material obtido diretamente do hospedeiro, os protozoários apresentam-se conglomerados, com os flagelos aderentes entre si e ao corpo, raramente existindo exemplares que exibam alguns flagelos isolados e isso devido ao muco intestinal. Em virtude dos flagelos permanecerem colados entre si é que muitos autores descreveram esta espécie como apresentando apenas três ou quatro flagelos livres. Foi ALLEN (1936 e 1940) quem primeiro notou a existência de 5 flagelos livres nestes tricômonas. Para que os flagelos permaneçam livres, lavamos os protozoários em solução fisiológica, centrifugamos e desprezamos o líquido sobrenadante; em seguida adicionamos nova porção de solução



Trichomonas (Pentatrichomonas) eberthi (KENT, 1880) — figs. 4-6: com os 5 flagelos livres; figs. 7 e 8: aparentando só 4 flagelos livres; fig. 9: aparentando só 2 flagelos livres; fig. 10: mostrando a membrana ondulante parcialmente descolada.

fisiológica ao material e algumas gotas de carbonato de sódio a 2%, centrifugamos, rejeitamos o líquido sobrenadante e com o material do fundo do tubo executamos os esfregaços. A membrana ondulante coleia o protozoário desde a extremidade anterior até a posterior; uma de suas fibras marginais termina com ela, ao passo que a outra tem um percurso livre posteriormente, que varia entre 3 e 7µ. A fibra costal é bastante desenvolvida e percorre o corpo do flagelado desde o blefaroplasto até o fim da membrana ondulante, situando-se a meia distância entre a base desta membrana e o axostilo. O axostilo é semelhante ao descrito na espécie anterior.

Núcleo — Está situado na metade anterior do corpo; sua forma pode ser esférica, ovoide ou elipsoide. E' constituido por pequenos blocos juxtapostos, de cromatina.

Divisão — O processo de multiplicação em *T. (Pent.) eberthi* foi referido por TANABE (1926), que verificou a existência de 5 cromossômios.

Habitat — Intestino posterior, principalmente íleo, cecos e reto e fígado.

Hospedeiro — *Gallus gallus* L. *e Meleagris gallopavo* L.

Distribuição geográfica — Cosmopolita.

Cultivabilidade — Só conseguimos manter culturas de *Trichomonas (Pent.) eberthi* no meio L. E. S. de BOECK e DRBOHLAV (1925), a 37° C, como ALLEN (1938), fazendo os repiques cada cinco dias, no máximo semanalmente.

ALLEN (1936) já havia cultivado esta espécie no substrato sólido de BOECK e DRBOHLAV (1925), com parte líquida modificada e contendo quinanil; CAILLEAU (1939) conseguiu cultivá-la isenta de bactérias.

Especificidade — Ainda não investigada. HEGNER (1929) inoculou "per os" tricômonas provenientes dos cécos de galinha em 12 pintos de dois dias de idade. Todos se mostraram infectados a partir do dia seguinte, permanecendo nesse estado durante todo o período de observação, que foi de 102 dias.

Trichomonas (Tritrichomonas) columbae RIVOLTA *in* RAILLIET, 1885).

(Figuras 11-29)

Sin.: *Lophomonas columbae* RIVOLTA *in* RAILLIET, 1885.
Lophomonas columbae RAILLIET *in* NEUMANN, 1888.
Trichomonas columbae RAILLIET *in* NEUMANN, 1892.
Trichomonas columbae (RIVOLTA *in* RAILLIET, 1885) RAILLIET, 1893.
Trichomonas columbae GEDOELST, 1911.
Trichomonas columbae (RIVOLTA) *in* NEVEU-LEMAIRE (1912).

Forma — Ao exame a fresco os indivíduos flagelados apresentam-se piriformes, elipsoides ou ovoides; nos esfregaços, porém, a forma é muito variavel e frequentemente irregular. Foi verificada também a existência de formas ameboides e de formas senescentes.

Dimensões — As medidas foram tomadas segundo o critério adotado para o *T. (T.) gallinae.* A média dos comprimentos de 50 exemplares foi de 18,8μ, com o mínimo de 9,9μ e o máximo de 36μ. A largura média de 50 exemplares foi de 17,5μ, com o mínimo de 9,1μ e o máximo de 27,0μ.

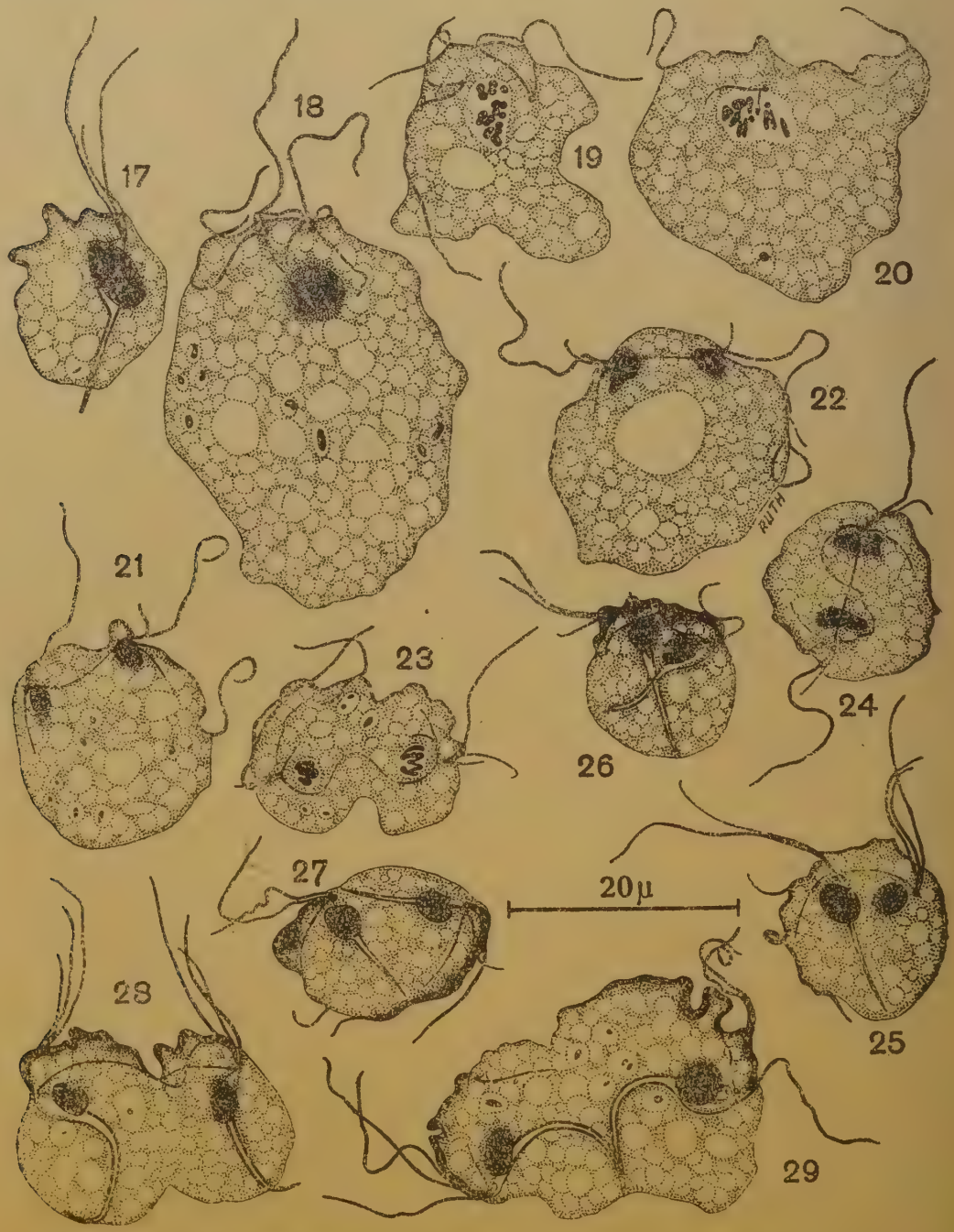
Aparelho cinético — Conseguimos verificar a existência de dois grânulos blefaroplásticos juxtapostos: um maior, de situação dorsal, e outro menor, ventral. Do grânulo dorsal originam-se as fibras (axonemas) de dois flagelos, as fibras marginais da membrana ondulante, a fibra costal e uma das fibras do axostilo. Do grânulo ventral partem o axomena de um dos flagelos e a outra fibra do axostilo. Ha três flagelos livres, sendo dois maiores, sub-iguais, aproximadamente do mesmo comprimento que o corpo do flagelado, ao passo que o terceiro mede cerca de 2/3 do comprimento do flagelo maior; este é ligeiramente maior que o corpo do tricômonas. A membrana ondulante percorre ape-

Trichomonas (Tritrichomonas) columbae (Rivolta *in* Railliet, 1885) — figs. 11-14: formas flageladas típicas; fig. 15: forma ameboide; fig. 16: forma senescente.

nas os 2/3 anteriores do corpo do flagelado. Na borda livre da membrana ondulante existem dois axonemas, dos quais um termina junto com a membrana ondulante, ao passo que o outro continúa como flagelo livre por uma extensão de 3 a 5μ. A fibra costal, situada na base da membrana ondulante, é geralmente muito curta, pois se estende desde o blefaroplasto até apenas a porção média da membrana ondulante. O axostilo é semelhante ao descrito em *T. (T.) gallinae.*

Núcleo — Está situado na região anterior do corpo, muito próximo ou mesmo sobre o capítulo do axostilo. Sua forma pode ser esférica, elipsoide ou ovoide. E' constituido por numerosos grânulos de cromatina, juxtapostos, que frequentemente simulam um todo homogêneo.

Divisão — Mantendo *T. (Trit.) columbae* em cultura, pudemos estudar seu processo de multiplicação, retirando material da cultura e fazendo esfregaços, principalmente de culturas novas, onde a reprodução é mais intensa.



Trichomonas (Tritrichomonas) columbae (RIVOLTA *in* RAILLIETT, 1885) — fig. 17: aspecto da prófase; figs. 18 e 19: aspectos da metáfase; figs. 20-22: aspectos da anáfase; figs. 23-27: aspectos da telófase; figs. 28 e 29: aspectos da divisão citoplásmica.

A prófase (fig. 17) inicia-se com o aumento de volume do núcleo, tornando-se os blocos de cromatina mais espaçados, mais nítidos e menos numerosos. O núcleo atinge o dobro ou o triplo das dimensões apresentadas quando em repouso.

Os aspectos que conseguimos verificar em seguida a estes são os da metáfase, havendo 10 cromossômios alongados, em halteres, iniciando sua duplicação (figs. 18 e 19) (esta espécie tem, portanto, 10 cromossômios). A membrana nuclear desaparece, ficando os cromossômios aparentemente em contacto com o citoplasma. Os tricômonas já se encontram, então, bastante simplificados em sua estrutura, havendo desaparecido o axostilo, a membrana ondulante e a fibra costal. Nesta fase, notamos já se ter verificado a divisão do blefaroplasto, ou melhor, a separação de seus grânulos em dois blocos, de cada um dos quais partem dois ou três flagelos. Estes grânulos blefaroplásticos, que se comportam como o aparelho da esfera, orientando a divisão, afastam-se um do outro, mas permanecem ligados entre si por um ou dois filamentos (desmoses) até o fim da telófase (figs. 21 — 24 e 28).

Os cromossômios completam sua divisão e aparecem então justapostos, dois a dois: este é portanto o início da anáfase (fig. 20); em seguida, os cromossômios separam-se em dois blocos, caminhando cada um para um dos polos da célula.

Uma vez atingidos os polos da célula pelos blocos de cromossômios inicia-se o rearranjo nuclear e o dos orgânulos cinéticos, isto é, começa a telófase. Os cromossômios confundem-se (fig. 23) e em seguida partem-se, sucessivamente, em blocos cada vez menores. Pouco a pouco, notamos uma delimitação cada vez mais nítida do núcleo, surgindo a membrana nuclear que separa os blocos de cromatina do citoplasma. Quanto ao aparelho cinético, notamos que inicialmente reconstituem-se as membranas ondulantes, os flagelos livres e em seguida as fibras costais (figs. 23 e 24); forma-se um dos axostilos (fig. 25) e logo em seguida o outro (fig. 26).

Posteriormente o citoplasma começa a se estrangular (figs. 28 e 29), separando-se os dois indivíduos.

Habitat — Intestino delgado, principalmente o duodeno.

Hospedeiro — *Columba livia domestica* L.

Distribuição geográfica — Cosmopolita.

Cultivabilidade — O *T. (Tritr.) columbae* é facilmente isolavel e cultivavel no meio de soro-salino-citratado de Cleveland modificado por ALMEIDA *in* CUOCOLO (1942), a princípio em estufa a 37° C, posteriormente à temperatura ambiente. As culturas feitas em ampolas fechadas a lâmpada são muito mais ricas do que as mantidas em

DIAGNOSE DIFERENCIAL DOS TRICÔMONAS DE GALINHA E POMBO

	T. (T.) gallinae	*T. (Pent.) eberthi*	*T. (Trit.) columbae*
Dimensões	7,0 — 15,0 × 4,7 — 15,0 μ	7,0 — 13,0 × 4,3 — 11,6 μ	9,9 — 36,0 × 9,1 — 27,0 μ
Grânulos blefaroplásticos	conglomerados, dando a impressão de haver um único	4, sendo 1 maior e 3 menores	2
Flagelos livres	4, de comprimento progressivamente decrescente; o maior deles é ± do mesmo comprimento que o corpo	5, sendo 2 maiores sub-iguais ± do mesmo comprimento que o corpo, 2 médios sub-iguais e 1 pequeno	3, sendo dois maiores sub-iguais ± do mesmo comprimento que o corpo e 1 menor
Membrana ondulante	extende-se do blefaroplasto até próximo ao polo oposto	extende-se do polo anterior ao polo posterior do corpo	percorre apenas os 2/3 anteriores do corpo
Fibra marginal da membrana ondulante	termina junto com a membrana ondulante	forma um flagelo livre depois da membrana ondulante	forma um flagelo livre depois da membrana ondulante
Fibra costal	extende-se por cerca de 5/6 da membrana ondulante	ocupa toda a extensão da membrana ondulante	extende-se apenas até a metade da membrana ondulante
Axostilo	dilatado na porção anterior onde é menos coravel, afilando-se sucessivamente; curvo na parte média ou no terço posterior	semelhante ao de *T. (T.) gallinae*	semelhante ao de *T. (T.) gallinae*
Núcleo	esférico, elipsoide ou ovoide; constituido por pequenos blocos de cromatina	»	»
N.º de cromossômios	6 (STABLER, 1938)	5 (TANABE, 1926)	10
Habitat	porção pregástrica do tubo digestivo e fígado	intestino (íleo e cecos) e fígado	intestino (duodeno)
Hospedeiros	pombo, galinha, perú *Falco s. sparverius* L. *Buteo l. lineatus* (GMELIN) *Streptopelia risoria* (L.) *Zenaidura macroura carolinensis* (L.) *Munia oryzivora* (L.) *Brotogeris jugularis* (MUELLER) *Leptotila v. verrauxi* (Bonaparte)	galinha perú	pombo
Distribuição geográfica	cosmopolita	cosmopolita	cosmopolita

tubos de ensáio embuchados com algodão. As repicagens devem ser feitas semanalmente.

Especificidade — Esta espécie parece não ter sido revista desde o dia em que se tornou conhecida para a ciência. Não encontramos na literatura referências à sua transmissibilidade.

REVISION OF THE SPECIES OF THE GENUS "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836" FROM THE DOMESTIC FOWL AND PIGEON

Abstract

In this paper are duly characterised the three species of the genus Trichomonas Donné, 1836 occurring in fowl and pigeon. After a carefull critico-historical survey of the litterature dealing with the fowl and pigeon trichomonads, the AA. arrived to the conclusion that their names may be:

Trichomonas (Trichomonas) gallinae (RIVOLTA, 1878), *with four free flagella, at the upper digestive tract and liver from pigeon, fowl and other hosts;*

Trichomonas (Pentatrichomonas) eberthi (KENT, 1880), *wih five free flagella, at intestine, mainly ileum and coeca, from the fowl;*

Trichomonas (Tritrichomonas) columbae (RIVOLTA *in* RAILLIET, 1885), *with three free flagella, at the duodenum from the pigeon.*

BIBLIOGRAFIA

ALLEN, E. A. — 1936 — A Pentatrichomonas associated with certain cases of enterohepatitis or "blackhead" of poultry. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 55: 315-322.

ALLEN, E. A. — 1938 — Cultures of Pentatrichomonas sp. in vitro from the livers of chickens and turkeys. *Journ. Parasit.*, 24: 13.

ALLEN, E. A. — 1940 — A redescription of Trichomonas gallinarum Martin e Robertson, 1911, from the chicken and turkey. *Proc. Helminth. Soc. of Washington*, 7: 65-67.

BOECK, W. C. e J. DRBOHLAV — 1925 — The cultivation of Endamoeba histolytica. *Am. Jour. of Hyg.*, 5: 371.

BOS, A. v. — 1932 — Über Trichomoniasis bei Tauben. I — Die Kultur von Trichomonas columbae und ihre Bedeutung für die Diagnose der Trichomoniasis. *Centr. f. Bakt. Paras. u. Infect.*, I-Orig., 126: 550-553.

BOS, A. v. (*) — 1932 — Over trichomoniasis bij duiven. II — Localisatie van Trichomonas columbae in spontanegevallen. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 59: 1336-1341.

BOS, A. v. — 1933 — Über Trichomoniasis bei Tauben. III — Weitere Beobachtungen über die Kultur und Pathogenität von Trichomonas columbae. *Centr. f. Bakt. Paras. u. Infec., I-Orig.*, 130: 220-227.

Bos, A. v. — 1934 — Über Trichomoniasis bei Tauben. IV — Pathogenität von Trichomonas columbae für Mäuse. *Zentr. f. Bakt. Paras. u. Infec., I-Orig.* 132: 453-458.

Cailleau, R. — 1939 — Culture bacteriologiquement pure de *Trichomonas gallinarum*, flagellé du dinde. *C. R. Soc. Biol.*, 131: 873-875.

Callender, G. R. e J. S. Simmons — 1937 — Trichomoniasis (T. columbae) in the Java sparrow, Tovi parrakeet and Verraux's dove. *Am. Jour. Trop. Med.*, 17: 579-585.

Cauthen, G. — 1936 — Studies on Trichomonas columbae, a flagellate parasitic in pigeons and doves. *Am. Jour. Hyg.*, 23: 132-142.

Cauthen, G. e M. M. Harris — 1935 — The cultivation of Trichomonas columbae free from bacteria. *Am. Jour. Hyg.*, 22: 364-365.

Cuocolo, R. — 1942 — Relatório helmintológico da excursão científica a Juquiá realizada pelo Departamento de Zoologia em setembro e outubro de 1940. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 13: 305-320.

Davaine, C. — 1875 — Monadiens *in* Dict. Encycl. des Sci. Med. (Dir.: A. Déchambre), série 2e, tome 9: 115-130.

Doflein, F. — 1901 — Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger nach biologischen Gesichtspunkten dargestellt. G. Fischer, Jena, 274 pp.

Eberth, J. — 1861 — Über ein neues Infusorium im Darm verschiedener Vögel. *Zeitschr. Wiss. Zool.*, 11: 98-99.

Fonseca, O. O. R. da — 1915 — Estudos sôbre os flagelados parasitos dos mamíferos do Brasil. *Tése Inaugural, Fac. de Med.* do Rio de Janeiro, Tipogr. Leuzinger, 181 pp.

Fonseca, O. O. R. da — 1916 — Estudos sôbre os flagelados parasitos dos mamíferos do Brasil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, Rio de Janeiro, 8: 5-40.

Fonseca, O. O. R. da — 1920 — Estudo sôbre os flagelados parasitas. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, Rio de Janeiro, 12: 51-65.

Gabaldon, A. e J. Andrews — 1935 — Experimental lesions caused by Trichomonas columbae in the chicken. *Jour. Paras.*, 21: 451.

Gedoelst, L. — 1911 — Sypnosis de Parasitologie de l'homme et des animaux domestiques. H. Lamartin, Bruxelas, XX + 332 pp.

Hawn, M. C. — 1937 — Trichomoniasis of turkeys. *Jour. Infect. Dis.*, 61: 184-197.

Hegner, R. W. — 1929 — Transmission of intestinal protozoa from man and other animals to parasite free fowls. *Am. Jour. Hyg.*, 9: 529-543.

Kent, W. S. — 1880 — A Manual of the Infusoria. D. Bogue, Londres, vol. 2, 288 pp., estampas IX-XVI.

Kofoid, C. A. — 1939 — The significance of the number of flagella in Trichomonadidae. Vol. jubilare pro Prof. Sadao Yoshida, Osaka Nat. Hist. Soc., *Inst. Res. Micr. Dis.*, Osaka Imp. Univ., Osaka, 2: 59-64.

Kruse, W. — 1896 — Systematik der Protozoen *in* C. Fluegge — *Die Mikroorganismen*. F. C. W. Vogel, Leipzig, 2: 600-693.

Lanfranchi, A. — 1908 — Di una especiale forma morbosa nei piccioni dovuta ad un ematozoario della famiglia dei mastigofori. *Moderno Zooiatro*, Série 3, ano 2, suppl. ao n.º 6: 289-317.

Lanfranchi, A. — 1917 — Su di un nuovo genere di parassiti del sangue. *Ann. d'Igiene*, 27: 697-699.

Laveran, A. e F. Mesnil — 1901 — Sur la morphologie et la systematique des Flagellès à membrane ondulante (genres Trypanosoma Gruby et Trichomonas Donné). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 133: 131-137.

LEVINE, N. D., L. E. BOLEY e H. R. HESTER — 1941 — Experimental transmission of Trichomonas gallinae from the chicken to other birds. *Amer. Jour. Hyg.*, 33: (Sec. C) 23-32.

LEVINE, N. D. e C. A. BRANDLY — 1939 — A pathogenic Trichomonas from the upper digestive tract of chickens. *Jour. Am. Med. Ass.*, 95: 77-78.

LEVINE. N. D. e C. A. BRANDLY — 1940 — Further studies on the pathogenicity of Trichomonas gallinae for baby chicks. *Poultry Sci.*, 19: 205-209.

LEUCKART, R. — 1863 — Die menschlichen Parasiten und die von ihnen herruehrenden Krankheiten. C. F. Winter, Leipzig, VIII + 882 pp.

LEUCKART, R. — 1879-1886 — Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herruehrenden Krankheiten. C. F. Winter, Leipzig, XXXI + 897 pp.

LUEHE, M. — 1906 — Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre naechsten Verwandten *in* C. Mense — *Handbuch der Tropenkrankheiten*, 3: 69-268, J. Ambrosius Barth, Leipzig.

MARTIN, C. H. e M. ROBERTSON — 1909 — Preliminary note on Trypanosoma eberthi (Kent) (= Spirochaeta eberthi, Luehe) and some other parasitic forms from the intestine of the fowl. *Proc. R. Soc. London*, 81: — B, 385-391.

MARTIN, C. H. e M. ROBERTSON — 1911 — Further observations on the caecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates. *Quart. Jour. Micr. Sci.*, 57: 53-81.

MARTOGLIO, F. — 1917 — Su di un nuovo genere di parassiti del sangue. *Ann. d'Igiene*, 27: 561-563.

MIESSNER, H. e K. HANSEN — 1936 — Trichomoniasis der Tauben. *Deut. Tieraerz. Wochens.*, 44: 323-330.

NEUMANN, L. G. — 1888 — Traité des maladies parasitaires non microbiennes des animaux domestiques. Asselin et Houzeau, Paris, XV + 673 pp.

NEUMANN, L. G. — 1892 — Traité des maladies parasitaires non microbiennes des animaux domestiques. Asselin et Houzeau, Paris, XVI + 767 pp.

NEVEU-LEMAIRE, M. — 1912 — Parasitologie des animaux domestiques. J. Lamarr et Cie., Paris, II + 1.257 pp.

NIEMEYER, W. E. — 1939 — Paratyphoid and Trichomonas infection in pigeons. *Jour. Amer. Vet. Med. Ass.*, 94: 434-435.

NIESCHULZ, O. e A. BOS — 1936 — Über die Benennung und Morphologie der Taubentrichomonaden. *Zentralbl. Bakt.*, I — Orig., 133: 473-475.

PEREIRA, C. e W. F. DE ALMEIDA — 1940 — Sôbre a verdadeira natureza das "formas ameboides", dos pretensos "cistos" e "formas degenerativas" no gênero Trichomonas Donné, 1836. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 11: 347-366.

PEREIRA, C. e W. F. DE ALMEIDA — 1943 — Sôbre alguns preconceitos morfológicos no gênero Trichomonas Donné, 1836 e sua significação taxonômica. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 195-206.

PERRONCITO, E. — 1901 ? — I parassiti dell'uomo e degli animali utili e le piú comuni malattie da essi prodotte, 2.ª ed. ?, F. Vallardi, Milão, 632 pp.

PROWAZEK, S. v. e H. DE B. ARAGÃO — 1909 — Weitere Untersuchungen über Chlamydozoen. *Muench. Med. Wochensch.*, 56: 645-646.

RAILLIET, A. (*) — 1885 — Élements de zoologie médicale et agricole. 1.ª parte.

RAILLIET, A. — 1893 — Traité de zoologie médicale et agricole, 1.ª parte. Asselin e Houzeau, Paris, 2.ª edição, 736 pp.

RAKOFF, A. E. — 1934 — Results of intraperitoneal injections of laboratory animals with various trichomonad flagellates (Protozoa). *Am. Jour. Hyg.*, 19: 502-513.

RIVOLTA, S. (*) — 1878 — Una forma de croup prodotta da un infusorio, nei polli. *Giorn. Anat. Fisiol. Patol. Anim.*, 10: 149-154.

RIVOLTA, S. (*) — 1878 — Una specie di epatite caseosa prodotta da un infusorio nel piccione. *Giorn. Anat. Fisiol. Patol. Anim.*, 10: 154-157.

RIVOLTA, S. e D. DELPRATO (*) — 1880 — L'ornitojatria o la medicine degli ucelli demestici e semidomestici. G. G. Q. Uebelhart Libraio Editore, Pisa, 500 pp.

SCHAAF, J. e H. SCHERLE — 1938 — Über die Morphologie der Trichomonaden des Huhnes. *Zentralbl. Bakt.*, I — Orig., 141: 310-313.

SCHAAF, J. e H. SCHMITT — 1937 — Über die Morphologie von Trichomonas columbae. *Zentralbl. Bakt.*, I — Orig. 139: 126-129.

STABLER, R. M. — 1938 — The similarity between the flagellate of turkey trichomoniasis and T. columbae in the pigeon. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.*, 93 (N. S. 46): 33-34.

STABLER, R. M. — 1938 — Trichomonas gallinae (Rivolta, 1878) the correct name for the flagellate in the mouth, crop and liver of the pigeon. *The Jour. Parasit.*, 24: 553-554.

STABLER, R. M. — 1941 — The morphology of Trichomonas gallinae (= columbae). *Jour. Morph.*, 69: 501-515.

STABLER, R. M. e H. A. SHELANSKI — 1936 — Trichomonas columbae as a cause of death in the hawk. *Jour. Parasit.*, 22: 539-540.

STEIN, F. R. — 1878 — Der Organismus der Infusionsthiere. 3: (1), X + 154 pp., W. Engelmann, Leipzig.

TANABE, M. — 1926 — Morphological studies on Trichomonas. *Jour. Paras.*, 12: 120-130.

TRAVIS, B. V. — 1932 — Trichomonas phasiani, a new flagellate from the ring-necked pheasant, Phasianus torquatus Gmelin. *Jour. Paras.*, 18: 285-287.

TRAVIS, B. V. — 1936 — Studies on some trichomonad flagellates from birds with descriptions of five new species and two new varieties. *Iowa St. Coll. Jour. Sci.*, 10: 115-128.

VOLKMAR, F. — 1930 — Trichomonas diversa n. sp., and its association with a disease of turkeys. *Jour. Paras.*, 17: 85-89.

WALLER, E. F. — 1934 — A preliminary report on trichomoniasis of pigeons. *Jour. Am. Vet. Med. Ass.*, 84: 596-602.

WEINZIRL, J. — 1917 — Trichomoniasis of chicks: a new and highly fatal disease. *Jour. Bact.*, 2: 441-445.

WENYON, C. M. — 1926 — *Protozoology*. Baillère, Tindall and Cox, Londres, vol. 1, XVI + 778 pp.

WITTFOGEL (*) — 1935 — Vergleichende Studien über pathogene Trichomonaden. Inaug. Diss., Hanover.

YAKIMOFF, W. — 1934 — Trichomonades et spirochètes de la voie buccale d'un coq. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 27: 734-735.

(*) Não consultado o original

Vol. 14 — Art. 21 Dezembro de 1943

ESTUDOS SOBRE A DICOUMARINA - 3,3'-METILENO*BIS* - (4-HIDROXICOUMARINA)

I. HISTORICO E EXPERIENCIAS PRELIMINARES

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 5 figuras no texto

O problema da terapêutica antitromboplástica entrou num terreno completamente novo e inesperado, em virtude das brilhantes pesquisas de LINK e Col. (1941-42), que isolaram do trêvo dôce alterado *(spoiled sweet clover)* uma substancia anticoagulante e hemorrágica, a 3,3' - metileno*bis* - (4 - hidroxicoumarina), que na literatura médica americana vem abreviadamente denominada como Dicoumarina ou Dicumarol. O conhecimento perfeito da constituição química do principio anticoagulante e hemorrágico extraido do trêvo dôce *(Melilotus alba)* permitiu a HUEBNER e LINK (1941) sintetizarem um produto de propriedades biológicas idênticas às do produto obtido do trêvo dôce alterado. O histórico dessa verificação, da mais alta importância para a patologia animal e para a terapêutica humana, é o que passamos a fazer.

Foi SCHOFIELD (1924) quem primeiro estabeleceu o fato de que uma variedade de trêvo dôce *(Melilotus alba)*, alterado por uma silagem imperfeita, quando administrada a bovinos produz um defeito da coagulabilidade do sangue. Êsse defeito consiste num aumento consideravel do tempo de coagulação, o que leva à produção de hemorragias freqüentes e muitas vezes fatais, que se localizam sobretudo nos pontos que tenham sofrido pequenos traumatismos, habitualmente sem nenhuma importancia. Em 1929, RODERICK observou a ocorrência de uma doença semelhante, nos Estados Unidos, a qual se originava da administração do *Melilotus alba* que sofrêra alterações durante o processo de silagem. A doença foi então estudada por RODERICK (1929-31) do duplo ponto de vista da sintomatologia e do mecanismo etiológico. Os casos estudados por RODERICK se referiam a animais alimentados com o trevo doce alterado, os quais apresentavam forte tendência hemorrágica em virtude de operações banais. Um criador, por exemplo, praticou em 80 bezerros uma série de operações sem importância. Des-

ses 80 animais, 65 morreram de hemorragias, dentro de um ou dois dias depois da operação. A castração de 25 touros, alimentados com o trêvo dôce alterado, determinou a morte de 12 animais, por hemorragias. As hemorragias podiam ocorrer em qualquer parte do corpo, mas eram mais pronunciadas nas regiões submetidas a contínua pressão ou a pequenos traumatismos, como o tecido subcutâneo e os fascias intermusculares. Nenhuma alteração das paredes dos vasos pôde ser observada.

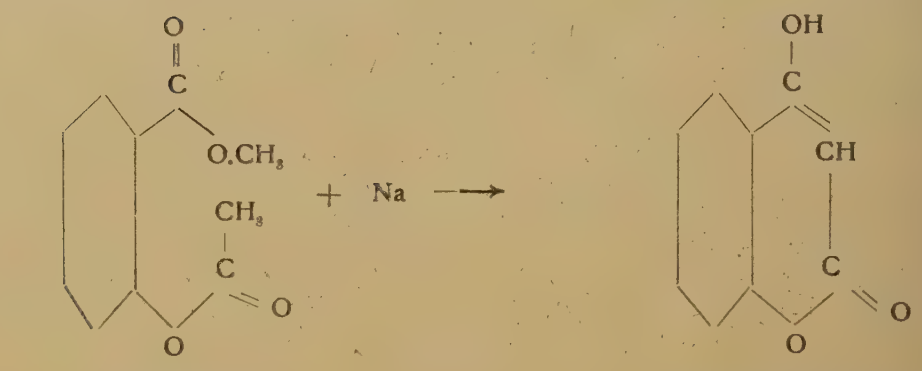
Em 1931, RODERICK estudou a doença do trêvo dôce, do ponto de vista etiológico, procurando determinar qual o mecanismo daquela incoagulabilidade sanguinea. As numerosas experiências realizadas mostraram de maneira nítida que se tratava de uma diminuição do teôr em protrombina no sangue circulante. A pesquisa de outras causas para aquela incoagulabilidade foi completamente negativa: "*No experimental evidence has been found to indicate that the delay in the coagulation time is due to the increase of an inhibitory principle of the nature of heparin or anti-thrombin*" (RODERICK, 1931). Determinações do calcio sanguineo não mostraram qualquer alteração apreciavel, em comparação com o teôr considerado normal. Das pesquisas de RODERICK ficou muito claro que a diminuição de protrombina no sangue circulante não era acompanhada de qualquer variação do teôr em plaquêtas.

As conclusões de RODERICK foram completamente confirmadas por QUICK, em 1936. Determinações do tempo da protrombina levaram QUICK a concluir, em experiências em coelhos, que a administração do trêvo dôce alterado aumenta consideravelmente aquêle tempo da protrombina. Mostrou ainda que a tendencia hemorrágica corre paralelamente com a redução da quantidade de protrombina no sangue circulante. Essa redução do teôr de protrombina do sangue circulante não dependia de uma possivel redução do conteúdo em vitamina K da dieta administrada aos animais. A administração de doses consideraveis de uma vitamina K sintetica — 2.metil-3. hidroxi-1,4. naftoquinona — não corrigia o defeito de coagulação produzido pela injestão de trêvo dôce alterado, como mostrou QUICK (1936).

A partir de 1934, CAMPBELL, ROBERTS, SMITH e LINK, na *Agricultural Experiment Station* da Universidade de Wisconsin (Madison), iniciaram trabalhos exaustivos de extração do príncipio ativo do trêvo dôce alterado *(Melilotus alba)*. Esse trabalho foi brilhantemente coroado de exito, pela obtenção, por CAMPBELL e LINK (1941), de um

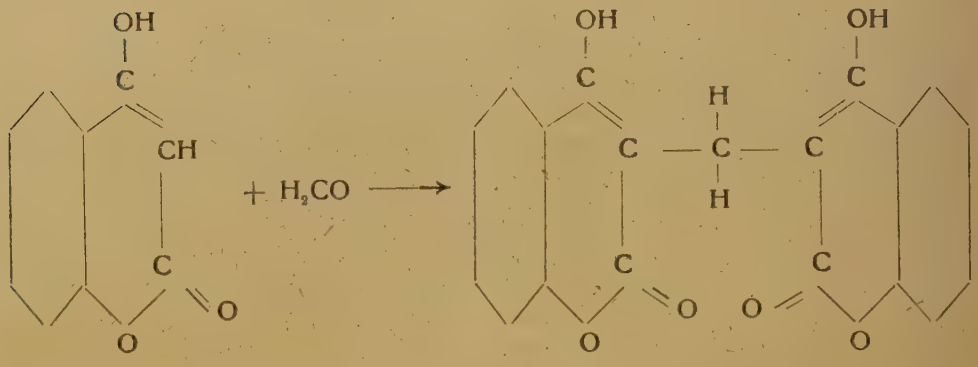
produto cristalino de fórmula bruta $C^{19}H^{12}O^6$ e de ponto de fusão 288° a 289°. Por ensaios biológicos em coelhos ficou demonstrado que 50 gramas do material de origem (feno alterado do *Melilotus alba)* apresentava uma atividade equivalente a 1,5 mgs da substância cristalina extraida pelo método de CAMPBELL e LINK. Esse ensaio biológico consistia em administrar por via bucal a quantidade de substância hemorrágica e determinar diariamente o teôr de protrombina no sangue circulante. A determinação desse teôr de protrombina no sangue circulante era realizada por uma modificação do método de QUICK (1936) e que foi descrita em detalhe por CAMPBELL, SMITH, ROBERTS e LINK (1941). A administração de uma única dose de 50 gms de trêvo dôce alterado produz, ao fim de 24 a 48 horas, uma rápida elevação do tempo da protrombina (periodo de destruição da protrombina). Durante 1 ou 2 dias esse tempo da protrombina se mantêm anormalmente elevado e finalmente começa a descer até o limite normal (periodo de restauração da protrombina). Variações equivalentes do tempo da protrombina puderam ser observadas pela administração de 1,5 mg do principio ativo cristalino, extraido do *Melilotus alba.* A administração repetida de doses elevadas do princípio ativo levava à produção de uma sintomatologia idêntica à da doença hemorrágica produzida pelo trêvo dôce alterado.

Posteriormente, STAHMANN, HUEBNER e LINK (1941) obtiveram o principio hemorrágico do trêvo dôce em quantidades suficientes para um estudo quimico desenvolvido, o qual levou finalmente à sua identificação aproximada com um composto descrito por ANSCHUETZ, em 1903, sob a designação de ácido α-metileno-*bis*-benzotetrônico, embora o ponto de fusão registrado para este último fosse cerca de 30° abaixo do principio hemorrágico extraido do *Melilotus alba.* Essa chave para o esclarecimento da constituição química do principio ativo do trêvo dôce permitiu aos pesquisadores americanos completar a sua síntese, a partir do acetil salicilato de metila. Como primeira fase da síntese, foi obtido o produto cristalino 4-hidroxicoumarina (ácido benzotetrônico), de ponto de fusão 210°, resultante da ação do sódio metálico sobre o acetil salicilato de metila. A 4-hidroxicoumarina, sob a ação do formol, é instantaneamente transformada em 3,3'-metileno*bis*-(4-hidroxicoumarina), que foi quimica e biologicamente identificada com o principio hemorragico extraido do trêvo dôce alterado. As equações seguintes mostram as duas fases da sintese da dicoumarina a partir do acetil salicilato de metila:



Acetil salicilato de metila

4-hidroxicoumarina (acido benzotetronico)



2 mols de 4-hidroxicoumarina + formol ⟶ 3,3'-metileno*bis*- (4-hidroxicoumarina).

A dicoumarina apresenta todas as propriedades químicas do produto cristalino extraido do trêvo dôce alterado e a sua identificação com o agente causador da doença hemorrágica produzida pelo *Melilotus alba* ficou absolutamente demonstrada em numerosas experiências realizadas por LINK e col. em coelhos, ratos, cobaias e cães (7, 15, 16, 23).

Desde então o produto sintético, sob a designação semicomercial de "Dicumarol", passou a ser experimentado em numerosos laboratórios e na clínica humana. Um relatório preliminar dos efeitos da dicoumarina administrada a cães e a um numero limitado de pacientes na Clinica Mayo, foi publicado por BUTT, ALLEN e BOLLMAN (1941). Administrada cronicamente a cães, na dose de 100 a 300 mgs, a dicoumarina produzia, depois de um tempo de latência de um a dois dias, uma elevação rápida e sustentada do tempo da protrombina e do tempo de coagulação. Mesmo depois de cessada a administração, e durante alguns dias, o tempo da protrombina e o tempo de coagulação se mantinham anormalmente elevados. Esses estudos preliminares foram completados por BOLLMAN e PRESTON (1942). A administração de 10

mgs de dicoumarina por quilograma de peso, em cães, produzia um aumento do tempo da protrombina de 10" para 90", ao fim do 3.º dia de administração. A partir do 4.º dia, o tempo da protrombina começava a declinar e tornava-se praticamente normal ao fim de 6 a 7 dias. A administração de doses maiores leva à habitual dilatação dos tempos de coagulação e da protrombina e a algumas alterações patológicas em certos órgãos. Particularmente o figado se apresenta frequentemente lesado, embora de maneira moderada, pela administração de 100 mgs de dicoumarina por quilo de peso. Hemorragias petequiais podiam tambem ser observadas em quase todos os órgãos internos. BINGHAM, MEYER e POHLE (1942) referem alterações ligeiras do figado de cães submetidos a um tratamento prolongado pela dicoumarina. As alterações encontradas por esses pesquisadores no fígado de cães eram entretanto nitidamente mais moderadas do que as referidas por BOLLMAN e PRESTON (1942) e por ROSE, HARRIS e CHEN (1942). Estes últimos pesquisadores administraram dicoumarina em doses crescentes a diversos animais de laboratório — cão, cobaia, coelho, rato, camondongo e macaco. Doses fatais de dicoumarina, administradas de uma só vez, pódem produzir a morte rápida em algumas horas, precedida de convulsões clônicas, elevação da temperatura retal e colapso circulatório. Nenhuma alteração do tempo de coagulação ou do tempo da protrombina pôde ser observada, quando eram administradas doses de dicoumarina que produziam a morte dentro de algumas horas. De acordo com as experiências de CHEN e col., a administração diaria de 1 mg de dicoumarina em coelho e de 5 mgs no cão (doses referidas à unidade de peso), invariavelmente produz a morte num prazo que póde variar de 10 a 30 dias. Na autopsia, são verificadas hemorragias patequiais ou difusas em todos os órgãos internos, edema pulmonar e anemia. Nos ratos, em quase 50% dos animais tratados pela dicoumarina, puderam ROSE, HARRIS e CHEN constatar necrose central do figado, o que aliás foi tambem constatado ocasionalmente nos camondongos e coelhos, submetidos ao tratamento crônico pela dicoumarina. CHEN e col. chamam a atenção para os efeitos tóxicos da dicoumarina, concluindo que essa substância é uma droga extremamente potente e que só com a maior cautela possivel pode ser usada na clinica humana.

Experiências interessantes são referidas por RICHARDS e CORTELL (1942), usando a técnica descrita por MURRAY, JAQUES, PERRET e BEST (1937). Segmentos de cerca de 1 polegada das veias radial e safena, em cães, eram temporariamente excluidas da circulação por pressão manual, e 0,15 a 0,25 cc de oleato de etanolamina ("Monolato", Abbott) eram injetadas na luz do vaso. A compressão era

sustentada por mais 3 a 4 minutos e em seguida a circulação restabelecida. Seis a sete dias depois, o segmento da veia era removido e examinado pelas técnicas histológicas correntes. Nos animais não tratados pela dicoumarina, trombos bem formados se desenvolviam em todos os segmentos venosos assim tratados, ao passo que nos que receberam 10 a 25 mgs diarios de dicoumarina, apenas excepcionalmente pôde ser observado um depósito de fibrina. RICHARDS e CORTELL experimentaram ainda a dicoumarina em cobaia e em macaco, obtendo resultados em tudo comparaveis ao dos outros investigadores citados. Exames histológicos do fígado dos animais mortos por tratamento crônico pela dicoumarina mostraram tendência à infiltração gordurosa e degeneração do parenquima hepático, com fócos de necrose. Essas alterações do fígado eram particularmente graves nos animais submetidos a uma dieta pobre em vitamina C, o que levou os pesquisadores citados a salientar uma possivel relação entre o teôr em vitamina C dos tecidos, e as alterações patológicas produzidas pela dicoumarina. Esses resultados estariam de acordo com as observações de OVERMAN, STAHMAN e LINK (1942) que mostraram que a administração de grandes doses de ácido ascórbico póde impedir completamente os efeitos anticoagulantes e hemorragicos da dicoumarina, em coelhos.

Resultados brilhantes obtidos na clinica humana são referidos por ALLEN, BARKER e WAUGH (1942), que apresentaram um relatório do uso da dicoumarina em 374 casos que tinham sido submetidos a diversas operações nas quais um perigo de tromboses e embolias fatais era relativamente grande. O escôpo da terapêutica pela dicoumarina foi manter o tempo da protrombina entre 35 e 60 segundos, durante o periodo de alarme de operações que frequentemente são complicadas por acidentes tromboplásticos. Para atingir esse abjetivo, a dicoumarina era administrada em doses que variavam de 100 a 300 mgs e os seus efeitos repetidamente controlados pela determinação do tempo da protrombina. Como a ação da dicoumarina só se faz sentir depois daquele tempo de latencia de 24 a 48 horas, em alguns casos, um tratamento prévio com a heparina foi realizado. Uma discussão estatistica de todos os casos estudados levou ALLEN e col. a concluir: "*Clinical and experimental studies strongly suggest the value of administration of dicoumarin in preventing vascular thrombosis*".

PRANDONI e WRIGHT (1942) realizaram um estudo clinico e farmacológico da dicoumarina no homem, estabelecendo as doses úteis para um tratamento clinico de doenças tromboplásticas. As observações destes últimos autores foram de preferência dirigidas no sentido de estabelecer a dosagem necessária para manter um tempo da protrombina entre 30 e 35 segundos (plasma não diluido), e além disso analisar

os efeitos desfavoraveis e a eficiência dos meios terapêuticos que pódem ser usados pelos clínicos em casos de acidentes pela administração crônica da dicoumarina. Embora tenham sido em pequeno número os doentes de tromboflebite tratados por PRANDONI e WRIGHT, estes autores referem que de 10 pacientes portadores de trombos venosos, 8 mostraram rápida melhora e cura, sem complicações, ao fim de 3 a 10 dias de tratamento. Dos dois casos rebeldes, um pôde ser completamente curado pela insistência no tratamento pela dicoumarina, ao passo que o último doente mostrou-se resistente a esse tratamento, mesmo depois da administração de grandes doses, durante quase um ano. BUTSCH e STEWART (1942) estudaram os efeitos da dicoumarina numa série de 130 pacientes portadores de diversas afecções tromboplásticas, como embolia pulmonar, tromboflebites, arterio-esclerose obliterante, etc. Os resultados mais brilhantes foram observados em pacientes portadores de tromboflebites da safena e da femoral. Em cinco dias a dôr tinha desaparecido e o edêma se mostrou sensivelmente reduzido. Os autores recomendam o uso da dicoumarina durante um periodo de pelo menos 4 semanas.

Na Suecia a dicoumarina foi primeiramente usada por LEHMANN (1942) não só em experiências em coelhos, como na clínica humana. LEHMANN mostrou que a dose letal de dicoumarina para o coelho é de 250 mgs por quilogramo de peso e que a morte aguda é sobretudo produzida por lesão renal. A substância administrada por via bucal, na dose de 3 a 4 mgs., não produz qualquer efeito tóxico apreciavel, além de uma consideravel quéda do teôr em protrombina do sangue circulante, Encorajado por essas experiências preliminares, LEHMANN (1943) passou a usar a dicoumarina na clínica humana em doses compreendidas entre 0,25 a 1 gm, por via bucal. Desessete casos de tromboses foram tratados por esse investigador e em todos os casos em que o tempo da protrombina se tinha elevado convenientemente, pela administração de dicoumarina, uma nítida melhora clinica pôde ser observada. Essas melhoras clinicas se traduziram por diminuição da temperatura local e do turgor da perna trombosada. Resultados favoraveis obtidos com o uso da dicoumarina na clinica humana foram ainda referidos por EVANS (1942), TOWNSEND e MILLS (1942), KLIEN (1943) e muitos outros.

PARTE EXPERIMENTAL

Dada a importância consideravel que poderá vir a ter a dicoumarina não só como agente terapêutico, mas tambem como preciôso reativo biológico para se atacarem problemas correlatos às funções do fígado, ao mecanismo da coagulação do sangue e de certas doenças

hemorragicas, decidimos repetir os trabalhos dos pesquisadores americanos.

Depois de alguns ensaios preliminares pudemos obter sinteticamente a dicoumarina, 3,3'-metileno*bis*-(4-hidroxicoumarina), seguindo o método descrito por HUEBNER e LINK (1941). Como a descrição detalhada da tecnica seguida no nosso laboratório poderá auxiliar a outros na obtenção do produto sintético, daremos a seguir o protocolo de uma das preparações. O rendimento obtido por HUEBNER e LINK na sintese da 4-hidroxicoumarina, a partir do acetil salicilato de metila é cerca de 35 % mais elevado do que o nosso. Na transformação da 4-hidroxicoumarina em 3,3'-metileno*bis*-(4-hidroxicoumarina), entretanto, o rendimento por nós obtido foi rigorosamente o mesmo indicado nas publicações dos autores americanos.

Sintese da 4-hidroxicoumarina: 100 gramas de acetil salicilato de metila foram aquecidos em banho de óleo até 165° a 170°, em beaker de 800 cc. Doze gramas de sódio metalico, dividido em pequenos fragmentos, foram adicionados no intervalo de 1 hora, sob continua agitação, mantendo-se a temperatura entre 165° e 178°. A simples retirada do beaker do banho de oleo era suficiente para baixar a temperatura quando esta mostrava tendência de se elevar excessivamente. Ao fim de 30 a 40 minutos a mistura se torna pastosa e dificil de agitar. Ao fim de uma hora, a mistura é retirada do banho de óleo e, antes de esfriar, transferida tão rapidamente quanto possivel para um gráo espaçoso. Depois de resfriada, a mistura sólida e avermelhada é tratada com cerca de 200 a 300 cc de alcool metílico e cuidadosamente triturada em gráo até quase completa dissolução do material. A solução violácea obtida é tratada com 500 a 600 cc de agua e em seguida acidificada ao Congo, pela adição cuidadosa de acido cloridrico a 10%. Os cristais começam a se depositar em abundancia, quando a mistura é francamente acida ao Congo. Ao mesmo tempo deposita-se um material oleoso de côr violácea. Depois de permanecer a mistura algumas horas na geladeira, os cristais são colhidos em Buchner e abundantemente lavados com solução a 10% de HCl. Sob forte sucção, o material oleoso atravessa o filtro. O material retido no filtro é em seguida redissolvido em cerca de 3 litros de agua em ebulição e depois de completamente dissolvidos os cristais, algumas gramas de carvão ativado são adicionadas e a ebulição prolongada por mais alguns minutos. Filtrado a quente em Buchner. A recristalização é repetida uma vez mais, com adição de nova quantidade de carvão, se necessário. Os cristais colhidos em Buchner, são secados em forno a 95° — 100°. Rendimento: 8,5 a 9,5 gramas. Ponto de fusão: 210°

Sintese da 3,3'-metileno*bis*-(4 hidroxicoumarina): 10 gramas do preparado seco obtido acima foram dissolvidos em 3 litros de agua e a temperatura elevada até 94-95°. Depois de completa dissolução do material, são adicionados cuidadosamente 6 cc de formol a 40%. Instantaneamente forma-se um precipitado abundante. O liquido sobrenadante, testado com 1 ou 2 gotas de formol, não deve mais precipitar. A mistura é resfriada á temperatura ambiente e o precipitado colhido por filtração em Buchner e lavado com cerca de 1 litro de agua distilada. Secado na estufa a 95° — 100°. Rendimento: 9,4 gramas. Ponto de fusão: 281°-284°.

O produto cristalino obtido apresenta as propriedades físicas e químicas do composto descrito por LINK e col. e extraido do trêvo dôce alterado. E' praticamente insoluvel na agua, a frio, mas póde ser dissolvido pela adição de um excesso de alcali. O ponto de fusão da 4-hidroxicoumarina correspondeu exatamente às indicações de HUEBNER e LINK e o P. F. da dicoumarina por nós sintetizada foi de alguns

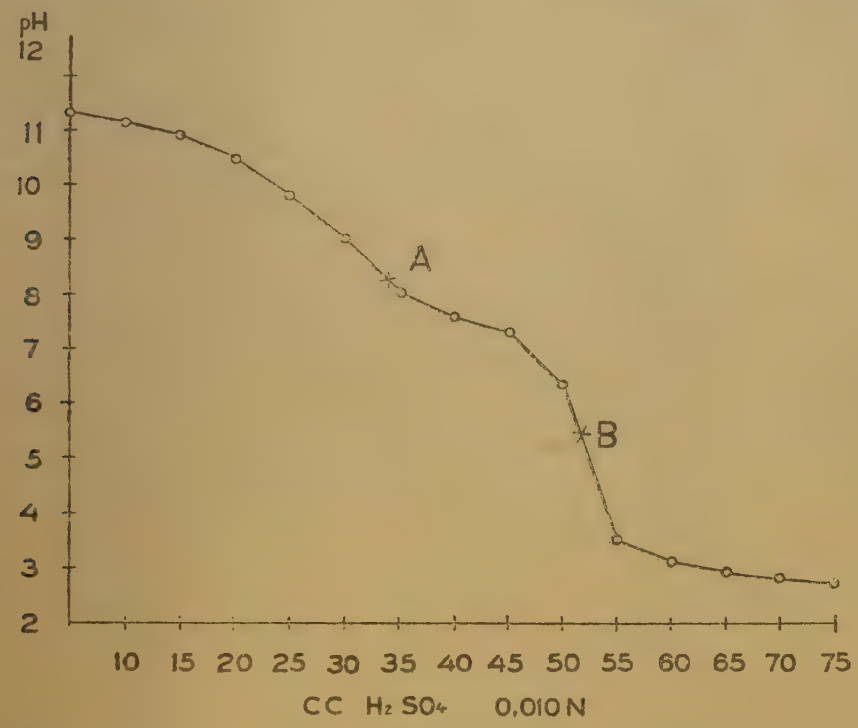


Fig. 1 - Curva de titulação electrométrica da dicoumarina. A e B indicam os dois pontos de inflecção correspondentes a pH = 8,3 e pH = 5,5. Solução de 30 mgs de dicoumarina em 5 cc de NaOH 0,105 normal

gráos abaixo do produto obtido pelos autores americanos, depois de recristalização a partir da acetona ou da ciclohexanona (287°-288°). Uma comparação melhor entre o produto por nós obtido com o material extraido do trêvo dôce por CAMPBELL e LINK, consistiu em determinar com um potenciometro de electródio de vidro (Coleman) as variações de pH de uma solução alcalina da dicoumarina, quando quantidades crescentes de H^2SO^4 0,01 normal eram adicionadas à solução (titulação electrométrica). Trinta mgs de dicoumarina foram dissolvidos em 5 cc de NaOH 0,105 normal e a solução titulada electrometricamente com uma solução 0,01 normal de H^2SO^4. O grafico da fig. 1 mostra as variações de pH em função das quantidades de solução de ácido sulfurico 0,010 normal adicionadas ao frasco de titulação. Se calcular-

mos a quantidade de ácido necessária para fazer variar o pH de 8,3 (ponto A) a 5,5 (ponto B), obteremos um equivalente de neutralização de 170 aproximadamente, sensivelmente concordante com o resultado obtido por CAMPBELL e LINK. Em todos os outros detalhes a curva obtida por CAMPBELL e LINK (1941) para o agente hemorrágico extraido do trêvo dôce se superpõe à obtida com o material por nós sintetizado.

Embora a identificação do composto pelas suas propriedades fisicas e quimicas tenha ficado clara, as experiências seguintes pódem ser consideradas como preliminares para a perfeita identificação das propriedades biológicas da substância por nós obtida com as do produto hemorrágico extraido por CAMPBELL e LINK do trêvo dôce alterado.

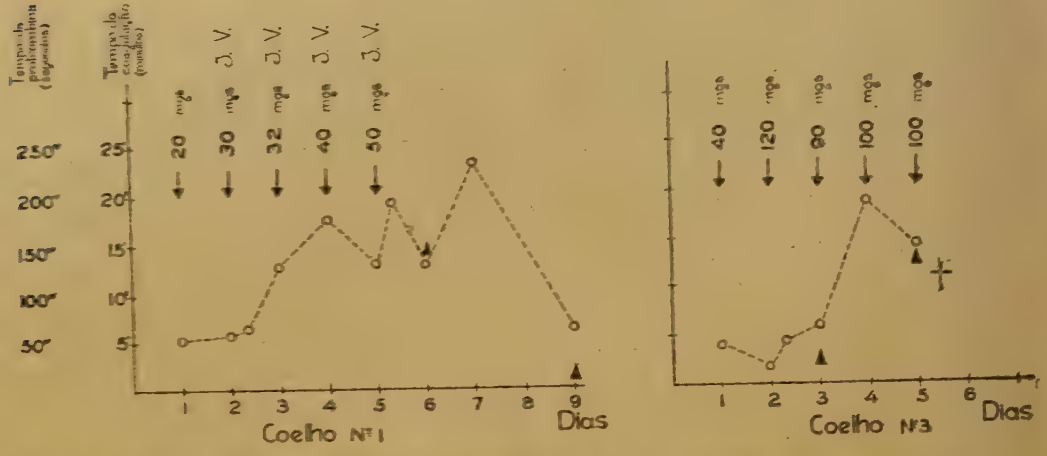


Fig. 2 - Variações dos tempos de protrombina e de coagulação, nos coelhos 1 e 2. As quantidades de dicoumarina indicadas nas setas foram administradas intravenosamente no coelho 1 e por via bucal no coelho 2. o - - - - o, tempo de coagulação; ▲, tempo da protrombina. Note-se o tempo de latência que precede qualquer alteração apreciavel na coagulabilidade sanguinea, depois de uma primeira dose de dicoumarina. O sinal † indica a morte do animal

A dicoumarina foi administrada em dias sucessivos a ratos e coelhos e a sintomatologia produzida correspondeu satisfatoriamente à descrita pelos pesquisadores americanos que já experimentaram o Dicumarol. Assim, por exemplo, dois ratos foram alimentados com uma dieta à qual era adicionada uma quantidade moderada (10 a 20 mgs) do produto sintético. Ao fim de uma semana desenvolveram o quadro típico da doença hemorrágica, em que predominavam hemorragias para os órgãos abdominais e alguns fócos de hemorragias cutâneas, cuja persistência coincidiu com um profundo estado de anemia. Numa outra série de experiências, coelhos de 2,5 a 4 quilos de peso foram tratados com quantidades variadas de dicoumarina e os efeitos típicos desta última sobre a coagulabilidade sanguínea foram verifica-

dos, não só pela determinação do tempo de coagulação, como tambem pelo teste mais fino do tempo da protrombina.

O tempo de coagulação foi determinado em amostras duplicatas de 1 a 2 cc de sangue total, colhido de uma das veias da orelha. De meio em meio minuto os tubos eram invertidos e o momento do aparecimento de um coagulo firme indicava o fim do processo da coagulação. A técnica seguida na determinação do tempo da protrombina foi uma adaptação da técnica de QUICK (1936) e consistiu em colher 1,8 cc de sangue da veia da orelha, em seringa contendo 0,2 cc de solução 0,1 M

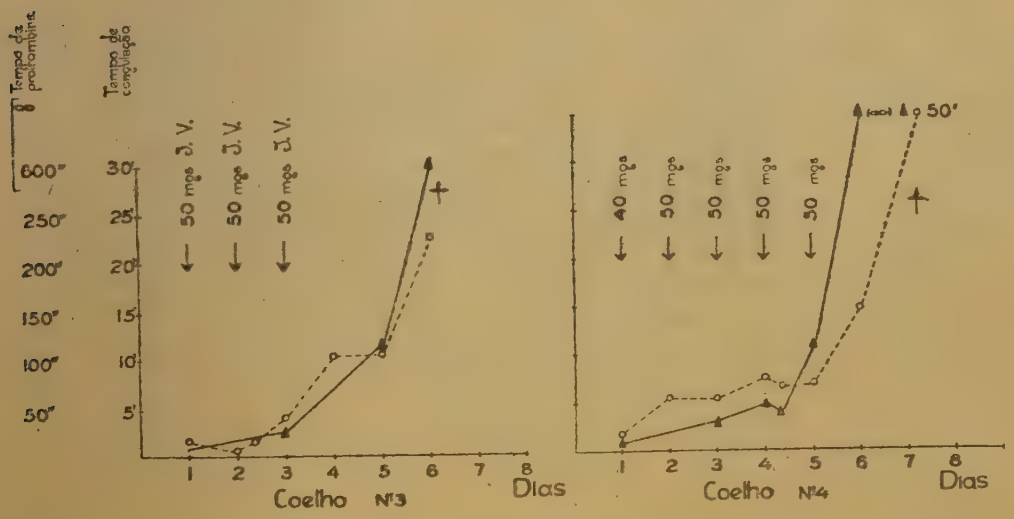


Fig. 3 - Variações dos tempos de coagulação e da protrombina nos coelhos 3 e 4. O coelho 3 recebeu as quantidades indicadas de dicoumarina, por injeção intravenosa, e o coelho 4, por via bucal. O tempo da protrombina se elevou a 10 minutos antes da morte, no coelho 3 e se tornou praticamente infinito nas 24 horas que precederam a morte do coelho 4.

de oxalato de sodio. Depois de centrifugação, o plasma oxalatado era colhido por meio de pipeta afilada munida de um bulbo de borracha, e amostras de 0,1 cc de plasma transferidas para pequenos tubos de ensaio, mantidos em termostato a 37 - 38°. Ao fim de 5 minutos, era adicionada a mistura calcio + tromboplastina (0,2 cc) e o tempo decorrido até o i n i c i o da formação do coagulo era medido por meio de cronômetro. A mistura calcio + tromboplastina era preparada adicionando-se 5 cc de emulsão de cérebro de coelho (preparada de acôrdo com a técnica de QUICK) a 5 cc de solução 0,025 M de clorêto de calcio; a mistura é em seguida centrifugada e mantida antes do uso em termostato, a 37-38°.

A seguir descreveremos em detalhe algumas experiências preliminares realizadas em coelhos, reservando para trabalhos futuros a

descrição de experiências mais especificas, ora em curso, e referentes não só às alterações patológicas produzidas pelo agente hemorrágico, mas tambem à sua influência em certos fenômenos hemorrágicos (ARTHUS e SHWARTZMAN) e à ação de produtos antitóxicos do fígado sobre os efeitos toxi-hemorrágicos da dicoumarina.

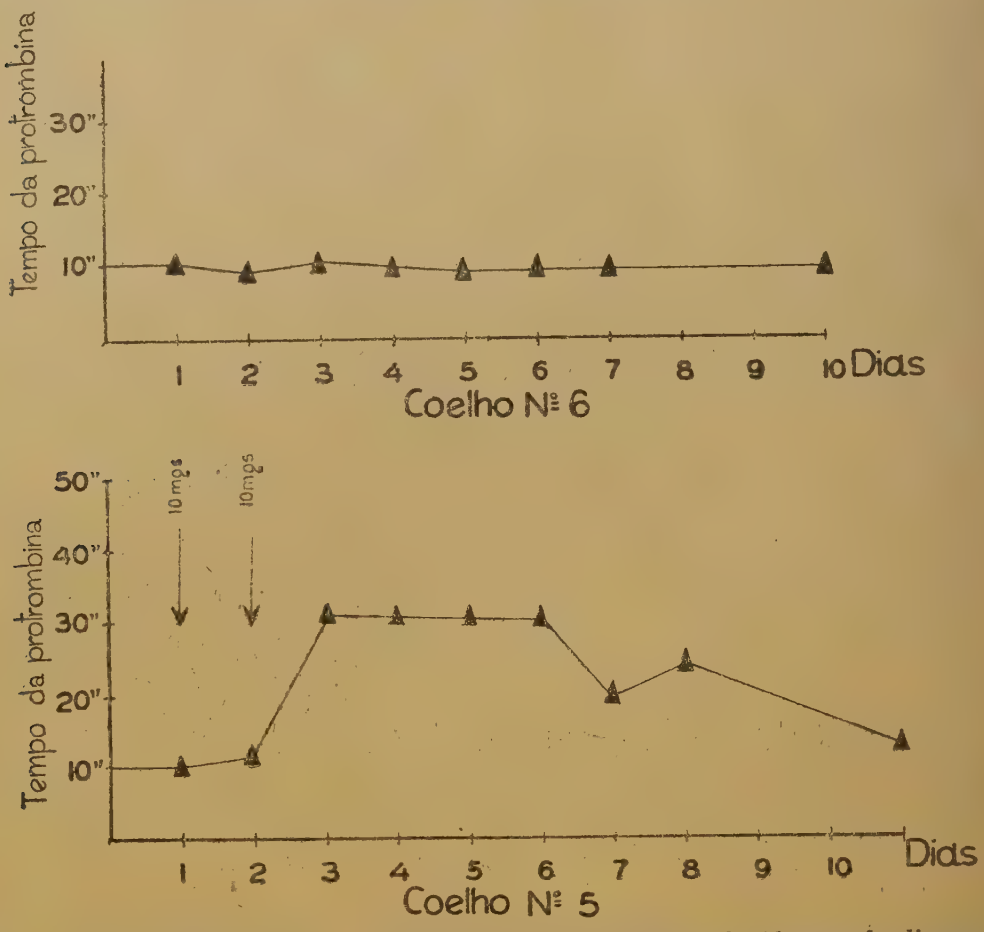


Fig. 4 - Experiências com o coelho 5, que recebeu 2 doses de 10 mgs de dicoumarina em dois dias sucessivos. Cessado o tratamento, os tempos da protrombina aumentaram até atingir um máximo. A volta ao normal se produziu lentamente. O coêlho 6, não foi tratado. Notar a estabilidade dos tempos da protrombina, num coelho normal

Das experiências em numero limitado realizadas com o objetivo de testar biologicamente a substância sintetizada pelo método de HUEBNER e LINK, destacamos as que foram feitas em cinco coelhos de pesos compreendidos entre 2,5 a 4 quilos. A dicoumarina foi administrada por injeção venosa nos coelhos 1 e 3 e pela boca, em capsulas apropriadas de gelatina, nos coelhos 2, 3 e 5. As doses administradas variaram de 10 a 120 mgs diarios. Com exceção dos coelhos 1 e 5, todos os outros morreram com a doença hemorrágica típica, como foi

descrita pelos autores citados anteriormente. Nos coelhos que morreram com tempo de protrombina muito elevado, hemorragias localizadas ou difusas nos órgãos internos puderam ser observadas. Um ou dois dias antes do desfecho final, os coelhos 2, 3 e 4 apresentaram profusas hemorragias gengivais, descoramento das mucosas (anemia?) coincidindo com um tempo da protrombina relativamente elevado, no coelho 2, e extremamente elevado nos coelhos 3 e 4. Algumas horas antes da morte do coelho 3, o tempo da protrombina se elevou a 600 e 650 segundos, ao passo que no coelho 4, o tempo da protrombina se tornou

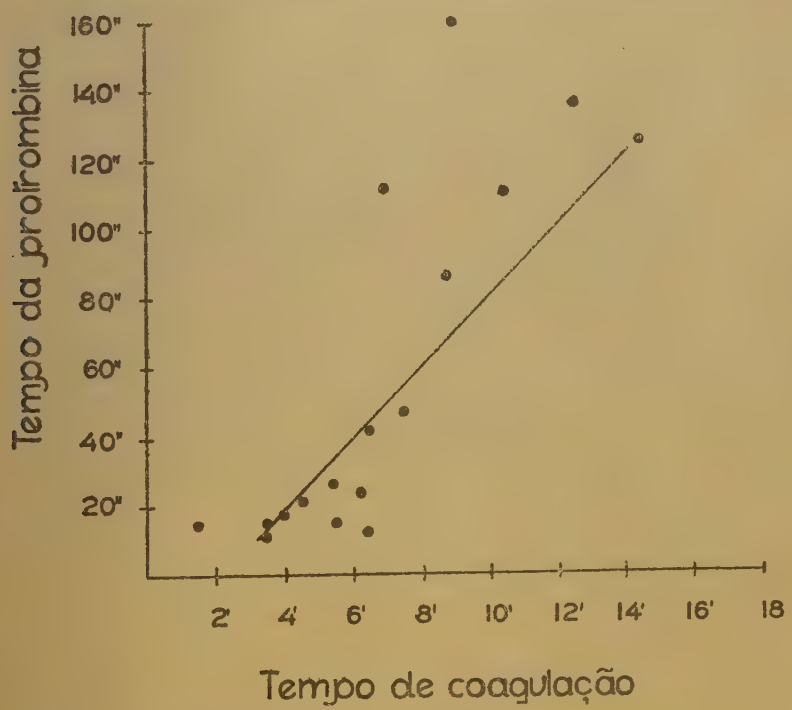


Fig. 5 - Correlação entre os tempos de coagulação e da protrombina. O traço cheio representa a linha de proporcionalidade perfeita. Pode-se ver que a correspondencia dos dois testes é imperfeita, notando-se uma tendencia a variações iniciais do tempo de coagulação corresponderem a variações dos tempos de protrombina menores do que seria de esperar, ao passo que os valores muito elevados dos tempos de protrombina correspondem a valores relativamente baixos do tempo de coagulação

praticamente infinito (superior a 1800 segundos). Hemorragias gengivais e da base do pavilhão da orelha puderam ser observadas neste coelho durante as 48 horas que precederam a morte. Uma amostra de sangue retirada do ventriculo esquerdo imediatamente depois da morte mostrou um tempo de coagulação de 50 a 60 minutos. O tempo da protrombina se manteve infinito até o momento da morte. Esse fato

mostra a possibilidade de uma depleção praticamente total da protrombina pela administração de doses relativamente grandes de dicoumarina.

Em todos os coelhos experimentados pôde-se notar nitidamente o tempo de latencia de 1 a 2 dias que se segue à administração da dicoumarina antes que um retardo substancial da coagulabilidade sanguinea pudesse ser observado pela medida do tempo de coagulação ou da protrombina. Como se póde ver nos gráficos das figuras 2 e 3, correspondentes aos coelhos 1 e 3, esse tempo de latência não depende da via de introdução, porquanto aparece mesmo em animais que receberam a dicoumarina por via intravenosa, em solução alcalina. No coelho 1, apezar das doses relativamente altas de dicoumarina injetadas na veia, houve primeiramente uma elevação dos tempos de coagulação e da protrombina e em seguida, depois de 3 dias de cessada a administração, uma volta ao normal. Tratava-se de um coelho bastante forte, de 4 quilos de peso. Nos dias que se seguiram ao maximo dos tempos de coagulação, o animal se apresentou abatido e profundamente anemiado (descoramento das mucosas). Um processo hemorrágico interno, com perda de sangue devia ter-se desenvolvido discretamente, com recôbro completo ao fim de 9 a 10 dias de experiência. Uma sangria realizada no 9.º dia de experiência mostrou uma nitida fluorescencia esverdeada do plasma oxalatado.

Procuramos verificar se existia um paralelismo entre o tempo de coagulação do sangue total e o tempo da protrombina, medido pela técnica referida acima. O grafico da figura 5 mostra que embora pareça haver na maioria dos casos um paralelismo satisfatório entre uma e outra determinação, as discrepancias foram numerosas e dificeis de explicar sem uma experimentação suplementar. O teste do tempo de coagulação pareceu-nos muito grosseiro e impreciso para um estudo acurado dos efeitos da dicoumarina. Frequentemente a diferença nos tempos de coagulação de duplicatas, colhidas em condições identicas, atingiu a 3 e 5 minutos. Além disso, a leitura do teste é imperfeita, dada a dificuldade de se ter um critério uniforme para o momento exato em que a coagulação se torna completa. Dessas experiências concluimos que o teste do tempo da protrombina, dada sua simplicidade e rapidez, póde perfeitamente dispensar o teste mais grosseiro do tempo de coagulação.

Não podemos deixar de salientar que as experiências aqui referidas não sairam do terreno toxicológico e visaram antes reproduzir a doença hemorrágica como tinha sido observada em coelhos pela administração do trêvo dôce alterado ou pela administração do produto sintético 3,3'-metileno*bis*-(4-hidroxicoumarina). A toxidez desta

última substancia, como foi verificada nos testes acima, não poderá servir de argumento contra o seu uso na medicina humana, em doses moderadas e rigorosamente controladas. Experiências em curso visam justamente contribuir para um melhor conhecimento da farmacologia da substância e dos agentes que poderão ser usados no combate aos seus efeitos tóxicos indesejaveis.

Agradecemos ao prof. Q. Mingoja a preparação do acetil salicilato de metila, que foi usado na síntese da 4-hidroxicoumarina. A determinação dos tempos da protrombina e a titulação electrométrica foram feitas com a assistência da Dra. Sylvia O. Andrade.

STUDIES ON DICOUMARIN — 3,3'-METHYLENE*BIS*-(4-HYDROXYCOUMARIN). I. HISTORICAL SURVEY AND PRELIMINARY EXPERIMENTS

Abstract

This paper deals with preliminary experiments performed on Dicoumarin. As an introduction, a detailed history of the spoiled sweet clover disease and its etiological agent — Dicoumarin — is presented. Details of the technique used in this laboratory for synthesizing Dicoumarin are described. There were no substantial variations from Huebner and Link's procedure, but many details omitted in their report are referred to in the present publication.

The identification of the final product was made by using electrometric titration with a glass electrode (Coleman) and checking up the physical and chemical constants of the substance. A perfect agreement with Campbell and Link's data for the substance extracted from spoiled sweet clover, was obtained. Further identification of the substance was made through biological assays on rats and rabbits. Given intraveously or by mouth, Dicoumarin definitely increased the prothrombin time after a latent period of 1 to 2 days. In 3 rabbits, the prothrombin time went up to ∞, *and the animal died a few hours later. A profound anemia, slight liver damage, hemorrhages and death were common occurrences in our experiences on rats and rabbits. The normal prothrombin time in the rabbit averaged 10 to 12 seconds, by diluting plasma to 1/1 or 1/2, following Quick's one stage method of prothrombin determination.*

Further experimentation on Dicoumarin, now in progress, deals with the effect of the substance upon hemorrhagic phenomena (Arthus and Shwartzman) and with the action of liver extracts upon the Dicoumarin effects.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, E. V., N. W. Barker and J. M. Waugh — 1942 — A preparation from spoiled sweet clover. A clinical study. *Journ. of Amer. Med. Ass.*, **120**: 1009-1015.
2. Barker, N. W., H. R. Butt, E. V. Allen and J. L. Bollman — 1942 — The effect of 3,3' - methylene-bis-(4-hydroxycoumarin) on blood coagulation factors. *Journ. Amer. Med. Ass., 118:* 1003-1004.
3. Bingham, J. B., O. O. Meyer and F. J. Pohle — 1941 — Studies on the hemorrhagic agent 3,3'-methylenebis-(4-hydroxycoumarin). I. Its effect on the prothrombin and coagulation time of the blood of dogs and humans. *Amer. Journ. of Med. Sci.*, **202**: 563-578.
4. Bollman, J. L. and F. W. Preston — 1942 — The effects of experimental administration of dicoumarin. *Journ. of Amer. Med. Ass.*, **120**: 1021-1025.
5. Butsch, W. L. and J. D. Stewart — 1942 — Clinical experiences with dicoumarin - 3,3' - methylenebis - (4-hydroxycoumarin). *Journ. of Amer. Med. Ass.*, **120**: 1025-1026.
6. Butt, H. R., E. V. Allen and J. L. Bolman — 1941 — A preparation from spoiled sweet clover (3,3' - methylenebis - (4-hydroxyoumarin) which prolongs coagulation and prothrombin time of the blood. Preliminary reports of experimental and clinical studies. *Proc. Staff Meet., Mayo Clin.*, **16**: 388-395.
7. Campbell, H. A. and P. K. Link — 1941 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IV. The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. *Journ. of Biol. Chem.*, **138**: 21-33.
8. Campbell, H. A., W. K. Smith, W. L. Roberts and P. K. Link — 1941 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. II. The bioassay of hemorragic concentrates by following the prothrombin level in the plasma of rabbit blood. *Journ. of Biol. Chem.*, **138**: 1-20.
9. Evans, J. A. — 1942 — Orientation of treatment in thrombophlebitis, phlebothrombosis and pulmonary embolism. *Annals Int. Med.*, **17**: 970-974.
10. Huebner, C. F. and K. P. Link — 1941 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *Journ. of Biol. Chem.* **138**: 513-527.
11. Klien, B. A. — 1943 — Anticoagulant therapy of occlusion of central vein of retina in relation to pathogenesis and differential diagnosis. *Archives of Ophtalmology*, **29**: 699.
12. Lehmann, J. — 1942 — Hypoprothrombinemia produced by 3,3' - methylenebis-(4-hydroxycoumarin) and its use in the treatment of thrombosis. *Science*, **96**: 345-346.
13. Lehmann, J. — 1943 — Thrombosis: Treatment and prevention with methylene-bis - (4-hydroxycoumarin). *Lancet*, **1**: 611.
14. Murray, D. W. G., L. B. Jaques, T. S. Perrett and C. H. Best — 1937 — Heparin and thrombosis of veins following injury. *Surgery*, **2**: 163.
15. Overmann, R. S., J. B. Field, C. H. Baumann and K. P. Link — 1942 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IX. The effect of diet and vitamin K on the hypoprothrombinemia induced by 3,3' - methylenebis - (4-hydroxycoumarin) in the rat. *Journ. of Nutrition*, **23**: 589-602.

16. Overmann, R. S., M. A. Stahmann and K. P. Link — 1942 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. VIII. The effect of 2-methyl-1,4-naphthoquinone and l. ascorbic acid upon the action of 3,3'-methylenebis-(4-hydroxycoumarin) on the prothrombin time of rabbits. *Journ. of Biol. Chem.*, **145**: 155-162.

17. Prandoni, A. and I. Wright — 1942 — The anti-coagulants. Heparin and the Dicoumarin — 3,3'-methylenebis - (4-hydroxycoumarin). *Bullet. New York Acad. of Med.*, **18**: 433-458.

18. Quick, A. J. — 1936 — The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease of dietary origin. *Amer. Journ. of Physiol.*, **118**: 260-271.

19. Richards, R. K. and R. Cortell — 1942 — Studies on the anti-coagulant 3,3' - methylenebis - (4-hydroxycoumarin). *Proc. of the Soc. for exp. Biol. and Med.*, **50**: 237-242.

20. Roderick, L. M. — 1931 — A problem in the coagulation of the blood. "Sweet clover disease of Cattle". *Amer. Journ. of Physiol.*, **96**: 413-425.

21. Rose, C. L., P. N. Harris and K. K. Chen — 1942 — Toxicity of 3,3'-methylenebis - (4-hydroxycoumarin). *Proc. of the Soc. for exp. Biol. and Med.* **50**: 228-232.

22. Schoffield, F. W. — 1924 — Damaged sweet clover: The cause of a new disease in cattle simulating hemorrhagic septicemia and blackleg. *Journ. Veter. Med. Ass.*, **64**: 553-575.

23. Stahmann, M. A., C. F. Huebner and K. P. Link — 1941 — Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *Journ. of Biol. Chem.*, **138**: 513-527.

24. Townsend, S. R. and E. S. Mills — 1942 — Effect of synthetic hemorrhagic agent, 3,3' - methylenebis - (4-hydroxycoumarin) in prolonging coagulation and prothrombin time in human subject. *Canad. Med. Ass. Journ.*, **46**: 214-218.

25. Wright, I. S. and A. Prandoni — 1942 — The dicoumarin 3,3'-methylenebis -(4-hydroxycoumarin). Its pharmacologic and therapeutic action in man. *Journ. of Amer. Med. Ass.*, **120**: 1015-1021.

Vol. 14 — Art. 22 Dezembro de 1943

A "ESCAMA VERMELHA" DOS CITRUS EM SÃO PAULO

"AONIDIELLA AURANTII (MASKELL)" (HOMOPTERA-COCCOIDEA)

POR

H. S. Lepage

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto e estampas 22-30

I — HISTÓRICO

A *Aonidiella aurantii* (MASKELL, 1878), vulgarmente conhecida por "escama vermelha", é uma das mais sérias pragas das plantas cítricas do mundo. A Austrália, os Estados Unidos, notadamente a Califórnia, a África do Sul e parte do México, têm sido os países onde mais prejuizos ela tem causado. Em outras partes, como na Palestina, Chipre, Rodes, Argentina, Paraguai e Chile, a cochonilha não se tem apresentado com o mesmo carater grave.

Atualmente é vasta a distribuição da "escama vermelha". Alem dos países citados, ela é ainda encontrada na África Oriental Inglesa, Brasil, Caucásia, Ceilão, China, Creta, Fijí, Grécia, Indo-China, Itália, Japão, Malta, Ilhas Maurícias, Marrocos, Nova Caledônia, Nova Zelândia, Ilhas Filipinas, Porto Rico, Samôa, Sul da Europa e Antilhas.

A "escama vermelha" foi constatada inicialmente na Ásia; a descrição original, porem, baseou-se em exemplares colhidos sôbre limões (*Citrus limonum* RISSO) procedentes de Sídnei, na Austrália. Da Austrália foi introduzida, com mudas cítricas, nos Estados Unidos e depois na África do Sul, onde se tornou a pior praga dos *Citrus*. Nos Estados Unidos foi introduzida em S. Gabriel, na Califórnia, entrando por São Francisco, onde chegou procedente da Austrália, possivelmente alguns anos antes. Desde essa época o inseto se foi adaptando e espalhando por outros Estados; mas onde ele é mais particularmente prejudicial é na California, onde causa prejuizos anuais de cêrca de Cr $ 48.000.000,00.

A rapidez com que se espalhou no Paraguai e Argentina, onde data de poucos anos a sua introdução, leva-nos a encarar esse coccídeo como uma praga seríssima.

LOUNSBURY constatou a praga na África do Sul como a mais danosa para os *Citrus*, achando que o inseto já ali devia existir mais de 50 anos antes da sua suposta introdução, em 1895.

Enfim, tem-se verificado que em todas as regiões cujo clima apresente analogia com o da Califórnia, a "escama vermelha" desen-

volve-se rapidamente, adaptando-se bem. Contrariamente, nos lugares muito úmidos o inseto não adquire o carater de praga.

No Brasil, há mais de 40 anos é conhecida a existência da *Aonidiella aurantii*, sôbre roseiras, em grande número de localidades, parecendo tratar-se de uma forma ecologicamente diferente da que ataca os *Citrus*, pois tendo sido encontrada nas proximidades de laranjeiras, não passou para esta planta.

A existência dessa forma que ataca a roseira foi verificada no Estado de São Paulo, nas seguintes localidades: Pirassununga, Amparo, Campinas, São Paulo, Santos, Tremembé, São João da Bôa Vista, São José do Rio Pardo, Piracicaba, Santa Lúcia, etc..

Nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraiba e Rio Grande do Sul, tambem foi encontrada essa forma que ataca a roseira.

Examinando os fichários da Secção de Entomologia do Instituto Biológico, lá encontramos os seguintes dados a respeito da "escama vermelha", quanto aos *Citrus:*

Em 9 de Maio de 1932, foi examinada uma laranja procedente da chácara do Sr. GUSTAVO BACKEUSER, em Tucuruví, na Cantareira, atacada pela *A. aurantii.*

Em 1 de Junho de 1936, foi examinado um galho de "lima da Pérsia", colhido em Limeira pelo Dr. J. GONÇALVES CARNEIRO, na qual foi encontrada a *A. aurantii.* Em 28 de Março de 1936, foram examinados limões da mesma procedência (Chácara Dierberger) atacados pela *A. aurantii.*

Em 1936, o foco da *A. aurantii* encontrado em Limeira foi eliminado e em inspeções seguintes, feitas pelos Drs. E. HAMBLETON, J. FERRAZ DO AMARAL, J. PINTO DA FONSECA e A. O. MARTINS, não mais foi encontrada a praga em questão.

Em 1937, é ela verificada em Pitangueiras, pelo Dr. A. A. BITANCOURT, conforme relatório do Sr. J. PINTO DA FONSECA, Chefe da Secção de Parasitologia Vegetal.

Em 8 de Outubro de 1937, foram examinados por nós galhos de tungue (*Aleurites fordii* HEMSE), procedentes do Paraná, fortemente atacados por esta praga.

Nos outros locais tambem desapareceu o diaspíneo, com exceção de Pitangueiras, onde se desenvolveu rapidamente; no Paraná não mais foi examinado o foco, não se sabendo, por isso, do seu estado.

Recentemente, em 1941, encontramos a *Aonidiella aurantii* em abundante material de *Citrus* spp. procedente de S. Gonçalo, Condado, Curema e outras localidades da Paraiba do Norte, e de Lima Campos, no Estado do Ceará. Tal material foi enviado pelo Eng. Agr. MANOEL ALVES DE OLIVEIRA, agrônomo fitossanitarista do Posto Agrícola de

S. Gonçalo, que o remeteu juntamente com outros 50 coccídeos, afim de serem por nós determinados. O Instituto Biológico comunicou ao Dr. A. F. MAGARINO TORRES, Diretor da Divisão de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, a ocorrência da praga na Paraiba, e este designou técnicos federais para inspecionar a região, afim de estudar a disseminação da praga. No Nordeste do país, de acordo com as diversas remessas de material feitas pelo técnico citado, constatamos a "escama vermelha" em *Citrus*, spp., tamarindo *(Tamarindus indica* L.), roseira *(Rosa*, sp.) e mamoeiro *(Carica papaya* L.).

Em material enviado do Rio Grande do Sul pelo Dr. R. GOMES COSTA, em Agosto de 1942, verificamos a presença da "escama vermelha" sôbre tungue.

II — BIOLOGIA

Não tendo sido ainda estudada a biologia da *Aonidiella aurantii* no Brasil, daremos, a seguir, a sua biologia na Califórnia, onde provavelmente será bastante semelhante.

A "escama vermelha" é ovovivípara, isto é, o ovo é incubado no corpo materno e dele nascem as formas jovens. Ocasionalmente estas emerjem ainda envoltas em uma membrana, o *amnion*, de que em seguida elas se despojam. A larva pode ficar debaixo do escudo materno desde poucas horas até 1 ou 2 dias, antes de se fixar e inserir seu aparelho bucal. Esta curta fase é o único período livre da fêmea; os americanos chamam-no de *crawler stage;* os nossos agricultores chamam essas larvas de filhotes.

Ao fixar-se, a forma jovem dobra suas pernas e antenas para baixo do corpo e dentro de 1 ou 2 horas aparece-lhe uma secreção branca, cotonosa, sôbre o corpo. Uma hora depois, fios brancos envolvem o inseto inteiro e se estendem para baixo, dos lados, até superfície onde ele se está fixando. Uma vez fixado, assim permanece toda a vida, excetuando-se o macho, cujo adulto é alado e que emerje sob o seu escudo.

O inseto toma a forma circular e move-se em torno de si mesmo com o fim de moldar apropriadamente sua cobertura, que é precária. Si esta for retirada, o inseto secretará uma nova.

Depois de um par de dias essa cobertura, especialmente ao redor da margem, fica mais compacta. A forma, a esse tempo, é a de um boné de copa chata e lados verticais, donde a designação que lhe dão os americanos, período do "boné-branco" — *white cap*. Depois de alguns dias esse boné se assenta em volta de um centro, deixando uma pequena proeminência, bico ou vértice donde o nome vulgar americano de estado de bico- —*nipple stage*. A' medida que a copa aumenta de

tamanho, espalha-se para fora até uma borda muito fina, na margem. Em 1 ou 2 semanas todo o efeito cotonoso desaparece e a capa se torna uma película compacta. Depois de 12 ou 15 dias a primeira exúvia ou pele despida fica incorporada ao interior e compõe a maior parte do escudo. Como o tamanho do inseto aumenta depois da primeira muda, é necessário que o escudo seja ampliado, isto é, extendido alem da pele despida quando a segunda exúvia foi incorporada ao escudo, o qual tem então mais ou menos duas vezes o tamanho da primeira exúvia, ambas formando círculos concêntricos. A segunda muda ocorre 10 ou 12 dias depois da primeira, na estação quente.

Antes da muda, o inseto, que até esse momento é facilmente separavel do seu escudo, fica firmemente aderido a ele. Durante esse período a parede do corpo torna-se quebradiça em vez de flexivel como acontece entre as mudas; o corpo é mais distendido e os seus conteudos são muito mais fluidos. A pele se racha ao redor da margem lateral, incluindo a margem dos lóbulos e placas do pigídio; consequentemente os caracteres do pigídio poderão ser vistos tanto na parte dorsal como na fraca e quase invisível parte ventral da pele despida. Na primeira exúvia as patas e antenas podem ser vistas porque são perdidas na primeira muda. O tempo gasto no processo da muda propriamente dita dura de 2 dias até uma semana.

Ao completar a segunda muda o inseto novamente extende seu escudo até que haja u'a margem cinzenta da capa, que se alonga alem do seu corpo. Este estado ou período do desenvolvimento é conhecido como de "adulto cinzento" *gray adult*.

E' durante esse período que ocorre a fecundação, entrando logo depois o inseto no período de reprodução; o seu escudo fica de novo inteiramente associado ao inseto e não pode dele ser facilmente separado.

A longevidade do inseto depende do tempo, depois da maturidade, em que ocorrer a fecundação.

Após atingir a maturidade e estando fecundado (não há reprodução partenogenética), os filhotes são produzidos a uma média de 2 ou 3 por dia, até 150. O período de reprodução dura cêrca de 2 mêses, podendo, entretanto, ser grandemente aumentado, no inverno.

Os sexos são indistinguíveis até depois da primeira muda, quando o escudo masculino toma a forma alongada. Os caracteres do pigídio são os mesmos que no segundo estado feminino, porem aparecem 2 pares de olhos conspícuos e vermelhos. Esses olhos não são visíveis imediatamente após a muda, desenvolvendo-se durante o período do segundo estádio. Depois da segunda muda a fêmea entra no período prepupal. Nessa ocasião indicações das antenas e das asas são visíveis e há uma forte indicação das pernas.

Depois da terceira muda o macho entra no período pupal. O estilo aparece e as formas dos apêndices são conspícuas. Da quarta e última muda emerge o macho adulto.

III — A OCURRÊNCIA DA "ESCAMA VERMELHA" EM SÃO PAULO

Os focos da "escama vermelha" sôbre roseira têm sido erradicados pela Secção de Vigilância Sanitária Vegetal, por arrancamento e fogo. São sempre focos pequenos e sem gravidade.

A — O fóco de Pitangueiras —

Sôbre *Citrus*, no Estado de São Paulo, existe presentemente apenas um fóco, representado pelas plantações da Sociedade Anônima Frigorífico Anglo, em Pitangueiras.

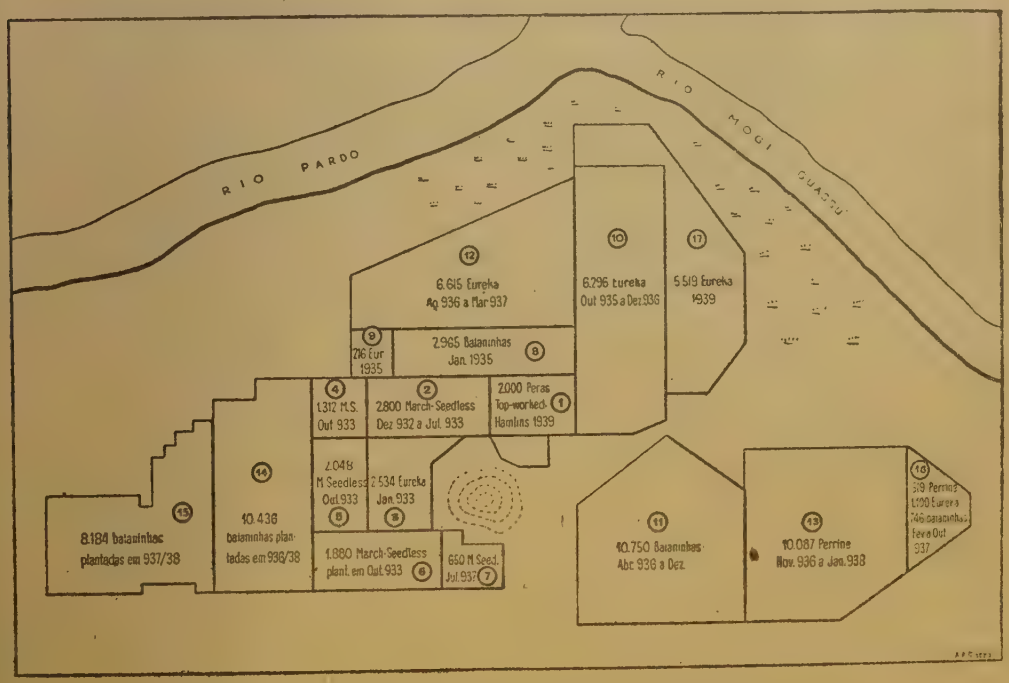


Fig. 1 — Plantação cítrica "Varjão" em Pitangueiras

Trata-se de 2 grandes pomares, de 33 mil e 77 mil pés de *Citrus*, plantados na fazenda "Três Barras". O aparecimento inicial da "escama vermelha" em Pitangueiras deu-se em 1934, segundo informações dos técnicos da S/A Frigorífico Anglo; o Instituto Biológico, porem, somente em 1937 teve conhecimento da existência da praga naquela localidade.

Segundo informações prestadas pelos técnicos da referida Cia., a primeira constatação do *red-scale* naquela fazenda foi feita em Agosto

de 1934, no bloco 3 da plantação de Varjão (ver o "Croquis" anexo, fig. 1) em limoeiros "Eureka". Os pés atacados, que foram arrancados e queimados, eram originários, tambem segundo informação, dos viveiros de Dierberger & Cia., em Limeira.

A segunda constatação da "escama vermelha" foi feita em Março de 1936, em limoeiros do bloco 9 da plantação de Varjão, formado com mudas oriundas tambem de Dierberger & Cia., em Limeira, de acordo ainda com informes dos técnicos da S/A Frigorífico Anglo. Nesse bloco as plantas foram raspadas e pulverizadas e até Junho de 1938 não mais foi encontrado o inseto.

Em 1937, apareceram novos focos nos blocos 1, 2 e 10, e em 1938, a praga espalhou-se praticamente em todos os blocos de Varjão, tendo tambem aparecido em Central (Ver o "croquis" da Fazenda, fig. 2).

No foco original de Limeira não foi encontrado o diaspidídeo em várias inspeções ali mais recentemente (1939) realizadas por técnicos do Instituto.

B — Primeiras medidas de Vigilância Sanitária Vegetal —

Em relatório apresentado em 5 de Maio de 1937 pelo Chefe da Secção de Entomologia ao Superintendente do Instituto Biológico, o referido técnico chamou a atenção para a gravidade da praga, lembrando as primeiras medidas a serem tomadas. As medidas recomendadas foram:

1.º) — Rigorosa inspeção em todo o Estado, afim de se precisar o grau de infestação da praga e localizar os focos de disseminação.

2.º) — Destruição dos focos já existentes, quando se tiver a certeza de serem êles limitados a poucas árvores. Uma vez constatada a presença da praga em qualquer pomar, devem as plantas infestadas ser imediatamente cortadas e incineradas, pois um tratamento por meio de inseticidas nem sempre dá resultado seguro.

3.º) — Tratamento por meio de inseticida, das demais plantas, mesmo as aparentemente não infestadas, que se encontrarem nas proximidades das árvores atacadas.

4.º) — Manutenção sob a mais rigorosa vigilância, do pomar em que forem encontrados focos do inseto, afim de serem imediatamente combatidos os novos que porventura venham a aparecer.

5.º) — Os citricultores, em seu próprio interesse, devem exigir que as plantas ou mudas que adquirirem sejam acompanhadas de um certificado de sanidade oficial, garantindo que se acham livres da praga.

Foram nessa ocasião examinados pelos técnicos da Secção de Vigilância Sanitária Vegetal todos os lugares onde havia sido assinalada a presença da praga, fazendo-se a erradicação dos pequenos fócos.

Fig. 2 — Planta geral da Fazenda Tres Barras em Pitangueiras, mostrando a situação dos pomares cítricos.

C — Apreensão e incineração de limões procedentes de Pitangueiras —

Em princípios de março de 1940, poucos meses após termos assumido a Chefia da Secção de Vigilância Sanitária Vegetal, estivemos no Mercado Municipal, onde verificamos, no depósito da firma Dierberger & Cia., 254 caixas de limões fortemente atacados pela *A. aurantii.* Os limões, segundo verificamos, eram procedentes das plantações da S/A Frigorífico Anglo, em Pitangueiras.

As 254 caixas de limões "Eureka" foram imediatamente apreendidas e incineradas nos fornos da Limpeza Pública da Zona Oeste da Cidade, conforme documentação fotográfica.

Em numerosos frutos tivemos a oportunidade de contar mais de 1.000 escudos da *A. aurantii.*

D — Inspeção em Pitangueiras em março de 1940 —

Como consequência dessa apreensão, fomos pela primeira vez a Pitangueiras, afim de fazer uma rigorosa inspeção na propriedade da S/A Frigorífico Anglo, de acordo com o relatório apresentado à Sub-Diretoria Vegetal. A referida Companhia possuia em Pitangueiras cerca de 110.000 Citrus, variando de 1½ a 7 anos, plantados em dois pontos, distantes um do outro cêrca de 12 quilômetros. A primeira plantação é denominada "Central", com 33.000 arvores, e a segunda, "Varjão", com 77.000 pés. (Vêr o "croquis" anexo, fig. 2).

Do ponto de vista cultural, os pomares da S/A Frigorífico Anglo são modelares. Pela fotografia que aqui incluimos (Estampa 22, fig. *A)*, poder-se-á verificar o excelente aspeto das árvores.

Apesar da pequena distância que separa "Varjão" de "Central", as condições de solo são diferentes, como bastante diferentes são as condições de umidade e temperatura entre esses dois pontos.

Encontrada inicialmente em limão "Eureka", a "escama vermelha" já passou para a "Baianinha" e para o pomelo "Marsh Seedless".

Nessa primeira visita, em 1940, tendo verificado que os tratamentos com óleo não eram eficientes contra a "escama vermelha", verificação que confirma o que sucedeu na Califórnia, e tendo em vista que tais pulverizações excessivas com óleo prejudicam as plantas, aconselhamos ao Sr. G. SEDDON, Gerente da Cia., o emprego de fumigação com gás cianídrico sob tenda, já experimentado, aliás, em Pitangueiras, único processo que tem dado alguns resultados na Califórnia, e mesmo assim não totais, porquanto já foi verificada a existência de formas da "escama vermelha" altamente especializadas e resistentes ao gás cianídrico.

O Sr. G. SEDDON concordou com o início do tratamento por fumigação, o qual, aliás, só pôde ser começado em 1940, devido à guerra. No ano de 1939, haviam sido feitas experiências com gás cianídrico, com "Calcite" Bayer e gás cianídrico líquido "Citrosan", da Duperial, em cêrca de 3.000 árvores, tendo o último produto dado quase 100% de mortalidade.

E — Circunscrição do fóco —

De regresso da nossa viagem, foram tomadas todas as medidas afim de evitar uma possivel disseminação da "escama vermelha", conforme cartas enviadas à Cia. Anglo e à Cia. Paulista de Estradas de Ferro. Foram as seguintes essas medidas:

1.º) — Não será permitido, na Estação de Pitangueiras ou por estradas de rodagem, o embarque de mudas, galhos, estacas, borbulhas de plantas Cítricas, sem uma "permissão" especial dêste Instituto, para cada partida.

2.º) — A exportação de frutos dessa Companhia só será permitida para a Inglaterra, e, assim mesmo, de frutos isentos de "escama vermelha".

3.º) — A Companhia só poderá embarcar caixas de tipo "exportação", na Estação dessa localidade, com guias da Secção de Fruticultura.

4.º) — Os embarques de frutos em caixas comuns ou em sacos, para a Capital, único mercado permitido, deverão constar de frutos isentos de "escama vermelha" e expurgados antes do embarque. Tais remessas deverão ser acompanhadas de guia dêste Instituto, que só as concederá a título de experiência.

5.º) — Todas as partidas condenadas em Santos pela Fiscalização portuária ou que não sejam exportadas por qualquer motivo, só poderão ser vendidas mediante autorização dêste Instituto.

6.º) — Todos os frutos atacados pela "escama vermelha", apanhados na "Casa de embalagem" dessa Companhia, deverão ser destruidos no local.

7.º) — Tendo este Instituto ciência de que a Companhia pretende, ainda este ano, enlatar pomelo nos seus Frigoríficos da Moóca, tais frutos deverão vir em vagões lacrados, diretamente para a Moóca, onde serão fiscalizados por este Instituto. Essa permissão vigorará tambem apenas durante este ano, pois para o futuro a industrialização deverá ser feita em Pitangueiras. As cascas dos frutos deverão ser queimadas.

8.º) — Tendo em vista a ineficiência das pulverizações com óleo, que, além de não eficazes contra a "escama vermelha", são prejudiciais às laranjeiras, deverá essa Companhia tomar providências urgentes afim de serem feitos tratamentos com gás cianídrico.

9.º) — A não observância das medidas citadas será motivo de penalidades previstas no referido regulamento de Defesa Sanitária Vegetal.

F — Erradicação da praga — Possibilidades —

Ao tomar as providências enumeradas, era pensamento da Secção de Vigilância Sanitária Vegetal tentar, pela última vez, tratamentos inseticidas e, caso não dessem resultados positivos, tomar medidas no sentido de ser proposta a destruição total dos pomares.

Tal medida de erradicação não foi entretanto julgada oportuna, por 4 motivos:

1.º) — indenização muito grande;

2.º) — situação dos pomares em lugar isolado, sem outros pomares cítricos nas proximidades;

3.º) — não haver mudas destinadas ao comércio;

4.º) — pessoal técnico da S/A Frigorífico Anglo, perfeitamente habilitado e conciente da necessidade de não deixar saír o inseto para outros locais.

G — Tratamentos já realizados em Pitangueiras

Alem dos tratamentos que descrevemos, feitos logo após a constatação da praga nos blocos 3 e 9, diversos tratamentos foram realizados, conforme quadros anexos 1 e 2, preparados com os dados fornecidos pelos técnicos da Cia. Frigorifico Anglo.

Para mais esclarecimentos, vamos relacionar todos os tratamentos feitos no bloco 3, fóco inicial da praga desde a sua constatação em 1934 até o ano de 1940. O bloco 3 é composto de 2.534 limoeiros "Eureka", plantados em 1933.

O bloco 10 é constituido por 6.296 pés plantados em 1935-1936.

Os demais blocos tiveram tratamentos mais ou menos iguais, de acôrdo com a maior ou menor infestação.

Os tratamentos realizados não lograram resultados positivos. Assim as pulverizações com "Albolineum" e óleo de caroço de algodão a 2 %, que causaram grande quéda de folhas, não deram os resultados esperados.

A própria fumigação com gás cianídrico em concentrações fortes (24 e 26 cc.), que pareciam ser decisivas, não o foram, entretanto.

A fumigação com gás cianídrico feita em 1940, nos mêses de agosto a setembro, em 26.216 arvores atacadas, custou à Companhia a importância de Cr $ 241.788,20.

Assim, no bloco 3, cujos tratamentos estamos acompanhando, antes da fumigação com gás cianídrico, em 1940, fez-se a contagem de 73,79 de escamas vivas nas folhas e 78,41 de escamas vivas nos galhos; após a fumigação, a contagem ficou reduzida à média de 0,76% de escamas vivas. Essa forte redução não teve, entretanto, significação, pois, 6 mêses após a fumigação, o bloco estava da mesma maneira atacado, embora os blocos visinhos tambem fossem fumigados.

Pelo exposto, verifica-se que os tratamentos, quer por pulverizações, quer por fumigações, em Pitangueiras, não deram os resultados esperados.

Quadro 1

TRATAMENTOS REALIZADOS NO BLOCO 3

Ano	Tratamento	Época	Observações
1934	"Talk-spray" 1,5 a 2%	Julho, Agosto e Setembro	
	Citrol a 2%	Novembro	
	Calda bordalesa	Maio, Julho e Agosto	
1935	"Talk-spray" 2%	Abril e Maio	
	Calda sulfo-cálcica	Abril, Junho e Julho, Agosto, Setembro, Outubro e Novembro.	
	Extrato de tabaco a 1%	Outubro	
	Gás cianídrico	Agosto	505 plantas
1936	Calda sulfo-cálcica	Janeiro, Fevereiro, Março, Abril, Maio, Julho, Agosto, Setembro e Novembro.	900 plantas
1937	"Albolineum" 2%	Maio, Junho e Outubro	
	Calda sulfo-cálcica	Fevereiro, Março, Abril, Maio, Junho, Julho, Agosto e Novembro.	
1938	Sulfato de nicotina a 1%	Agosto	
	"Albolineum" 2%	Março, Abril, Julho e Agosto.	
	Calda sulfo-cálcica	Outubro	
	Enxofre coloidal a 3%	Fevereiro e Março	
1938	Gás cianídrico a 2 cc.	Junho, Julho	
	Mistura "scale"	Agosto, Setembro, Outubro, Novembro e Dezembro.	
	Emulsão de óleo de carôço de algodão a 3%	Dezembro	180 plantas
	Calda bordalesa com 1% de "Albolineum"	Dezembro	
1939	"Albolineum" 2%	Março, Junho e Novembro	
	Calda sulfo-cálcica	Abril	2.052 plantas
	Enxofre coloidal	Abril	
	Gás cianídrico	Junho e Julho	1.271 plantas 1.262 plantas
	Emulsão de óleo de carôço de algodão a 3%		
	Calda bordalesa com "Albolineum" a 1%	Outubro	1.061 plantas
1940	Calda sulfo-cálcica	Janeiro, Fevereiro, Março, Abril, Maio e Junho.	
	Gás cianídrico		fumigação todo o bloco a 26 cc.

Quadro 2

TRATAMENTOS REALIZADOS NO BLOCO 10

Ano	Tratamento	Época	Observações
1937	"Albolineum" a 2%	Julho e Setembro	94 plantas
	Polvilhamentos com cal e enxofre	Julho, Setemb. e Dezembro	
1938	"Albolineum" a 2%	Março, Abril, Maio, Junho e Dezembro.	6.297 plantas
	Sulfato de nicotina a 1%	Maio	
	Polvilhamentos com cal enxofre (1-40) e (1-35)	Janeiro, Maio, Junho, Julho, Outubro e Novembro.	
	Enxofre coloidal a 2%	Fevereiro e Março	4.437 plantas
1939	Emulsão de carôço de algodão a 3%	Dezembro	todas as plantas
	Emulsão de carôço de algodão e timbó a 2,8%	Dezembro	60 plantas
	Emulsão de carôço de algodão, timbó a 2,8% e sabão	Dezembro	60 plantas
	"Albolineum" a 2%	Março	4.284 plantas
	"Albolineum" a 2%	Julho	370 plantas
	Calda bordalesa	Outubro e Dezembro	2.875 plantas
	Polvilhamentos com cal e enxofre (1-35 e 1-40)	Abril, Maio, Junho, Agosto, Setembro, Outubro e Novembro.	
	"Albolineum" a 1,8% e calda bordalesa	Outubro	2.871 plantas
	Óleo de carôço de algodão e calda bordalesa	Outubro	550 plantas
	Calda bordalesa de zinco	Dezembro	½ bloco
1940	Emulsão de óleo de carôço de algodão a 2,8%	Fevereiro	5.638 plantas
	Emulsão de óleo e timbó a 2% e sabão	Fevereiro	493 plantas
	"Albolineum" a 2%	Fevereiro	165 plantas
	Polvilhamento geral de cal e enxofre	Janeiro e Junho	
	Gás cianídrico com 24 cc.	Agosto	

H — Novas inspeções —

Após a nossa primeira viagem de inspeção, em 7 de Março de 1940, efetuamos diversas viagens a Pitangueiras, acompanhando muito de perto os tratamentos realizados e estudando juntamente com os técnicos da Companhia os resultados obtidos.

Em 1940, nos mêses de Agosto e Setembro, acompanhamos os serviços de fumigação com gás cianídrico, filmando diversos aspetos da operação.

Como fosse pequeno o estoque de gás cianídrico, devido à guerra, foram feitas diversas operações visando diminuir o volume das árvores e consequentemente economisar o produto.

Em alguns talhões foram feitas fortes podas; principalmente limoeiros e talhões de laranja Pera foram cortados, fazendo-se o *top-work* (Estampa 22, Fig. *B*).

A operação de fumigação sob tenda durou várias semanas e as contagens das escamas vivas, antes e após a operação, revelam o seguinte resultado:

Quadro 3

RESULTADO DA FUMIGAÇÃO COM GÁS CIANÍDRICO

	N.° do Bloco	Antes da fumigação Porcent. escamas vivas		Depois da fumigação Porcent. escamas vivas	
		Nas folhas	Nos galhos	Nas folhas	Nos galhos
	1	6,19%	4,94%	0,14%	—%
	2 parte	Fumigado	em Maio 1940	1,14%	—%
	2 "	3,88%	0,41%	—%	—%
	3	73,79%	78,41%	0,76%	0,76%
	4	12,21%	10,57%	—%	—%
	5	5,60%	7,85%	0,05%	0,07%
	6	Fumigado	em Maio	2,13%	—%
	7	2,14%	—%	0,10%	—%
	8	14,21%	6,48%	—%	—%
	9	37,44%	77,24%	0,04%	0,05%
podado	10 parte	—	—	0,16%	—%
podado	10 "	27,87%	8,43%	0,01%	—%
sem poda	12 "	—	—	0,72%	0,41%
sem poda	12 "	83,37%	85,53%	0,42%	0,13%

Pelos resultados obtidos logo após a fumigação, esperar-se-ia que o "red-scale" tivesse sido quase eliminado de Varjão. Tal, porem, não se deu: seis mêses após a fumigação, os pomares estavam com muito maior infestação que antes do tratamento. Em inspeção feita juntamente com os Drs. A. A. BITANCOURT e SPENCER CORRÊA DE ARRUDA, verificamos infestações consideráveis pelo coccídeo, em 1940.

I — Outros hospedeiros acidentais da "Escama vermelha" —

Nessa ocasião os pomares estavam tão infestados que pudemos observar a "escama vermelha" sobre *Citrus*, sobre "Capim marmelada" (*Brachiaria plantaginea* LINK.), "Guaxuma" (*Urena lobata* L.), "Vassourinha "(*Sida*, spp.) e "Nogueira de Iguape" (*Aleurites moluccana* (L.) WILLD.).

Após a fumigação houve um surto colossal da praga.

J — Abandono dos tratamentos —

Em fins de 1940, com a ida de vários técnicos da Companhia para a Europa, chamados às fileiras, e com as medidas econômicas adotadas pela Companhia, que anteriormente tencionava fumigar novamente todos os pomares em 1941, foram suspensos todos os tratamentos, quer contra a "escama vermelha" quer contra "verrugose", que prejudica seriamente os limões e pomelos.

Procurando encontrar uma justificativa para o acentuado declínio da praga, analisamos os dados meteorológicos locais do período de 1936-1943, abaixo apresentados, sem que neles pudéssemos encontrar variações que correspondessem áquele declínio. Uma vez assim concluindo, voltamos a nossa atenção para a possibilidade da ação de inimigos naturais.

K — O combate biológico —

Como consequência do abandono dos pomares e principalmente com a falta de pulverizações de calda bordalesa para controle da "verrugose" (*Elsinoe fawcetti* BIT. et JENKINS), que foram feitas quase o ano todo, verificou-se o aparecimento, em alguns pontos de vários blocos, de fungos entomógenos, principalmente *Nectria coccophila* (TUL.) WOLL. (*Sphaerostilbe coccophila* TUL.) forma imperfeita *Fusarium coccophilum* (DESM.) WOLL., (*Microcera coccophila* (DESM.)) e *Myriangium duriaei* MONT.

Esses fungos tiveram um desenvolvimento rápido e chegaram a cobrir árvores inteiras, conforme mostram nossas fotografias de galhos, fôlhas e frutos cobertos das frutificações vermelhas do fungo.

Ao lado dos fungos entomógenos, que se desenvolviam de maneira fantástica, observamos o aparecimento, em grande quantidade, de vários insetos, inimigos naturais da "escama vermelha", tais como:

Azya luteipes MULS., *Pentilia egena* MULS., *Cryptognatha*, sp., e *Coccidophilus citricola* BRÈTHES, principalmente o último, a cuja determinação, então feita pelo Prof. COSTA LIMA, ainda não se havia proce-

dido entre nós. Estes coccinelídeos não eram observados, nos anos anteriores, provavelmente devido às pulverizações com óleo.

Afim de auxiliar o desenvolvimento dos fungos estomógenos, foram feitas pelos técnicos da S/A Frigorífico Anglo pulverizações com suspensão de esporos, sendo para isso cortados galhos muito atacados que foram imersos em tanques, cujo líquido era pulverizado. Melhores resultados foram ainda obtidos com pedaços de galhos atacados pelo fungo, amarrados às árvores ainda não invadidas por ele.

Em poucos meses era rara a planta onde não houvesse o fungo e as "joaninhas" já referidas.

Os tratamentos contra a "verrugose" foram todos suspensos, havendo consequentemente o aparecimento de numerosos frutos atacados pelo fungo.

Trouxemos abundante material, afim de ser experimentada a produção de esporos em laboratório, para ajudar a propagação do fungo. Tal estudo esteve a cargo do Dr. GONÇALVES DA SILVA, sendo obtidas culturas puras. A obtenção de esporos da *Nectria coccophila* em cultura não foi, entretanto, conseguida.

As pulverizações com calda bordalesa, realizadas nos pomares quase durante todo o ano, controlavam os fungos entomógenos, de maneira que com a suspensão daquelas houve um formidavel surto dêstes.

L — Observações em laboratório —

Afim de fazer observações sobre a "escama vermelha" em laboratório, conseguimos com facilidade a infestação de numerosas "abóboras" (*Cucurbita pepo* L.) ("O Biológico" — H. S. LEPAGE, Vol. 9, Setembro de 1942), pela "Escama vermelha", bem como "pepinos" (*Cucumis sativus* L.).

As abóboras oferecem a vantagem de se obter o coccídeo por mais de um ano sôbre o fruto, o que não se dá com as laranjas e limões, que apodrecem. Pelas fotografias anexas verificar-se-á a grande vantagem de trabalhar com abóboras em logar de plantas inteiras.

No laboratório da Secção conseguimos criar com facilidade, sôbre essas abóboras infestadas, todas as "joaninhas" que atacam a "escama vermelha".

M — Observações em 1941 —

Em meiados de 1941, estando mais uma vez em Pitangueiras, notamos a grande diminuição de escudos da "escama vermelha". E' fáto conhecido que quando aparecem formas jovens do coccídeo há grande migração deles para os frutos. Nessa ocasião era dificil en-

contrar frutos atacados e estes com 4 a 5 escamas sómente, enquanto que, como já foi dito, em Março de 1940 numerosos eram os frutos com mais de 1.000 escudos, que se encontravam nos pomares.

N — Doença bacteriana da "escama vermelha" —

Outro fato interessante foi que o número de escamas aparecidas mortas era consideravel. Nos galhos novos, nos "ladrões", onde o inseto se desenvolve sempre muito bem, o número de escamas mortas era muito grande. Examinamos galhos inteiros sem encontrar uma escama viva. Todas se destacavam ao simples contato da mão.

Supondo tratar-se de doença bacteriana do coccídeo, trouxemos abundante material afim de ser isolada alguma bactéria. De fato o Eng.º Julio Franco do Amaral encontrou uma bacteria e um fungo do gênero *Fusarium*, que estão sendo estudados.

Acreditamos que a mortalidade das escamas seja causada pela bactéria e não por fungo, porque não observamos nas árvores examinadas as frutificações vermelhas da *Nectria*, tão comum em outros blocos na mesma ocasião.

Das bactérias isoladas foram feitas pulverizações sobre abóboras atacadas pela "escama vermelha", observando-se grande mortalidade de larvas recem-nascidas. As observações foram suspensas em virtude da estação fria, e deveriam ser reiniciadas em Outubro e Novembro, o que não se deu devido à falta de escama vermelha, que se tornou dificil de encontrar em Pitangueiras.

O — O controle da verrugose —

Com o abandono dos tratamentos da calda bordaleza houve grande aumento da "verrugose" nos limões e pomelos, porem o prejuizo representado por maior refugo de frutos com "verrugose" é bem menor que as despezas de controle da "escama vermelha". Agora, com o aproveitamento dos limões refugos para a extração do óleo essencial da casca, e dos pomelos refugos para alimentação do gado, a solução tornou-se mais facil.

Afim de controlar a "verrugose" sem o emprego da calda bordalesa, têm sido feitas as irrigações, que, antecipando as floradas, têm dado bons resultados, diminuindo sensivelmente seu ataque.

P — As duas formas biológicas da "escama vermelha" —

Experimentalmente temos conseguido a passagem, em laboratório, da forma de *A. aurantii* que ataca os *Citrus*, para a roseira, não tendo sido conseguido a passagem de forma da roseira, para *Citrus*. Aliás, em experiências feitas pelo Agrônomo Sanitarista Marcello de

TOLEDO PIZA, em Piracicaba, não foi possivel passar a "escama vermelha" da roseira para *Citrus*.

Q — As medidas de controle —

Com as medidas tomadas pela Secção junto das Companhias Anglo e Paulista de Estrada de Ferro, ficou controlada a saída de frutos de Pitangueiras. Esta Secção tem examinado centenas de pequenas partidas de laranjas e limões, antes de serem expostas à venda. Nos casos de verificação de "escamas" vivas, toda a partida é incinerada (duas partidas já foram inutilizadas).

Não havendo viveiro, ou melhor, não negociando a Companhia com mudas ou enxertos, e ficando os pomares a muitos quilômetros de qualquer outro, e não havendo mesmo nenhum pomar comercial na zona, parecia estar mais ou menos controlada a escama.

R — Viveiro cítrico em Pitangueiras —

Em 1940, entretanto, apareceu em Pitangueiras o Sr. JOSÉ PAULO SOARES, que instalou viveiros cítricos a menos de 10 quilômetros da Companhia Anglo. Tendo conhecimento do fato, entendemo-nos com o Dr. SARAIVA JR., Inspetor da Citricultura em Bebedouro, no sentido de não ser licenciado o viveiro. Em entendimento havido com o SR. JOSÉ PAULO SOARES, cujo viveiro foi interditado, ficou acordado que a Secção de Vigilância destruiría o viveiro, dando em troca 2.000 enxertos, que seriam fornecidos pelo Instituto Agronômico.

Tendo havido um entendimento entre o Instituto Biológico e o Instituto Agronômico, que concordou com a medida, foi em 28 de Outubro de 1941 incinerado o viveiro do Sr. JOSÉ PAULO SOARES, sendo-lhe fornecidos, como indenização, 2.000 enxertos de "Baianinha", que sairão diretamente do Instituto Agronômico para seu destinatário.

S — A "escama vermelha" sobre roseiras —

A Secção de Vigilância Sanitaria Vegetal tem feito a erradicação de vários focos de *A. aurantii* sobre roseiras, principalmente no Município de Campinas. Foi tambem constatado o coccídeo em Santos, São Paulo, Campinas, Valinhos, Amparo, São José do Rio Pardo, São João da Boa Vista, Piracicaba, Pirassununga e Pindamonhangaba.

T — Observações em 1942 —

Em nossas últimas inspeções à fazenda "Tres Barras", em 28-10-1941, verificamos a diminuição consideravel da "escama vermelha". São numerosos os escudos secos com as fêmeas mortas. Com o início da estação quente já há um grande número de "joaninhas".

A Companhia tem embarcado para São Paulo e Santos algumas partidas de laranjas, todas lavadas, escovadas e parafinadas, e que somente são postas à venda após exame dos técnicos desta Secção.

Com o aproveitamento do óleo essencial da casca das laranjas e limões refugo, que têm dado preços compensadores, e com os ótimos resultados obtidos na engorda do gado com pomelos, a situação em Pitangueiras afigura-se-nos outra que em 1939, quando realizamos a primeira inspeção. Nessa ocasião julgamos que somente a incineração dos pomares poderia erradicar a praga em São Paulo, em vista dos péssimos resultados obtidos com os tratamentos.

Si não houver modificação no procedimento dos inimigos naturais, e sendo evitados os tratamentos de combate da "verrugose", há esperanças do controle da praga, o que verificaremos nos próximos anos.

U — Observações em 1943. —

As inspeções realizadas em 1943 revelaram uma diminuição do inseto, confirmando as de 1942.

THE "RED-SCALE" ON CITRUS IN THE STATE OF SÃO PAULO *AONIDIELLA AURANTII* (MASKELL) (Homoptera-Coccoidea)

Abstract

This paper presents a historical outline and the geographical distribution of the "Red-Scale" Aonidiella aurantii (MASKELL *1878), as well as notes on its biology, incidence and control methods in the State of São Paulo-Brazil. Numerous charts and photographs illustrate this paper.*

BIBLIOGRAFIA

BERLESE, L. — 1895 — *Rivista di Patologia Vegetale*, 4: 83.

COSTA LIMA, A. DA — 1927 —Segundo Catálogo dos Insétos que vivem nas Plantas do Brasil, *Arquivos da Esc. Sup. de Agricultura e Med. Vet.*, Rio de Janeiro, 8: 124.

COSTA LIMA, A. DA — 1936 — Terceiro Catálogo dos Insetos que vivem nas Plantas do Brasil. *Escola Nacional de Agricultura*. Ministério de Agric., Rio de Janeiro. pag. 184, n.º 510.

FERRIS, G. F. — 1938 — Atlas of the scale insects of North America. Stanford University, Californa, 2: 179.

GREEN, E. E. — 1922 — The Coccidae of Ceylon. Dulau & Co. Ltd., London, 1: 58.

MASKELL, W. M. — 1878 — Transactions of the New Zealand Institute, 9: 199.

METCALF & FLINT — 1939 — Destructor and useful insects. McGraw — Hill Boock Co. N. York.

MC KENZIE, L. HOWARD — 1938 — The genus Aonidiella. *Microentomology*, 3: 1-36.

QUAYLE, H. G. — 1938 — Insects of Citrus and other sub-tropical fruits. Comstock Publishing Co. Inc. Ithaca — N. Y., pgs. 137, 148.

SOKOLOFF & E. J. KLOTZ — 1941 — Mortality of the red scale on Citrus through infection north a sporeforming bacterium. *Phytopathology*, 32, 3: 187.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 22

Fig. *A* — Vista parcial dos pomares cítricos da S/A Frigorífico Anglo em Pitangueiras, fóco da "escama vermelha" *Aonidiella aurantii* (MASK., 1878).

Fig. *B* — *"Top-Work"* visando o combate da "escama vermelha".

Estampa 23

Figs. *C* e *D* — Incineração de limões, apreendidos no Mercado da Capital de S. Paulo em 1939, no forno da Prefeitura.

Estampa 24

Fig. *E* — Limões atacados pela "escama vermelha" no forno de incineração da Prefeitura da Capital de S. Paulo.

Fig. *F* — Caixa com limões "Eureka" fortemente atacados pela "escama vermelha" apreendidos no Mercado Municipal da Capital de S. Paulo, procedentes da S/A Frigorífico Anglo, Fazenda Três Barras em Pitangueiras (1939).

Estampa 25

Fig. *G* — Limão apresentando cerca de 1000 escudos da "escama vermelha" *Aonidiella aurantii*, procedente de Pitangueiras (1939).

Fig. *H* — Folhas de *Citrus* atacadas pela "escama vermelha".

Estampa 26

Figs. *I* e *J* — Pulverisações com oleo mineral no combate ao *"red-scale"* (1940).

Estampa 27

Figs. *K* e *L* — Fumigação de *Citrus* com gás cianídrico.

Estampa 28

Fig. *M* — Galho de laranjeira atacado pela "escama vermelha" *Aonidiella aurantii.*

Fig. *N* — *Nectria coccophila*, fungo entomógeno, sobre a "escama vermelha" *Aonidiella aurantii* em galhos de *Citrus.*

Estampa 29

Fig. *O* — Folha de *Citrus* com pupas de "Joaninha" *Pentilia egena* (MULS.), predador da "escama vermelha".

Fig. *P* — Fungos entomogenos sobre escamas de "red-scale" (1940).

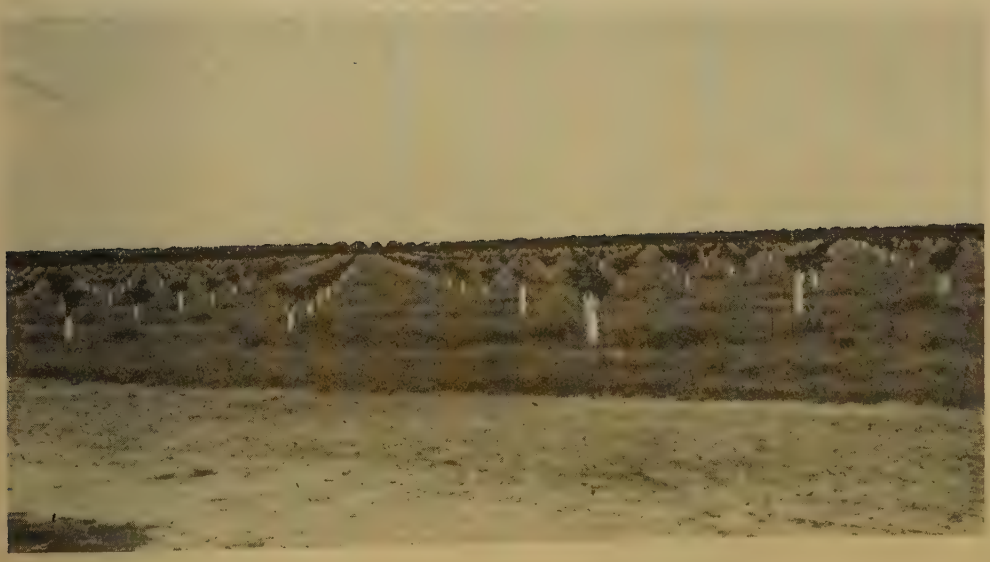
Estampa 30

Fig. *Q* — Abóbora infestada artificialmente pela "escama vermelha" no laboratório da Secção de Vigilância Sanitária Vegetal do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura, para estudos de combate e biologia do "red-scale" (1941).

Fig. *R* — Parte da casca de abóbora da figura *Q*.

———o———

A



B

C

D

E

F

G

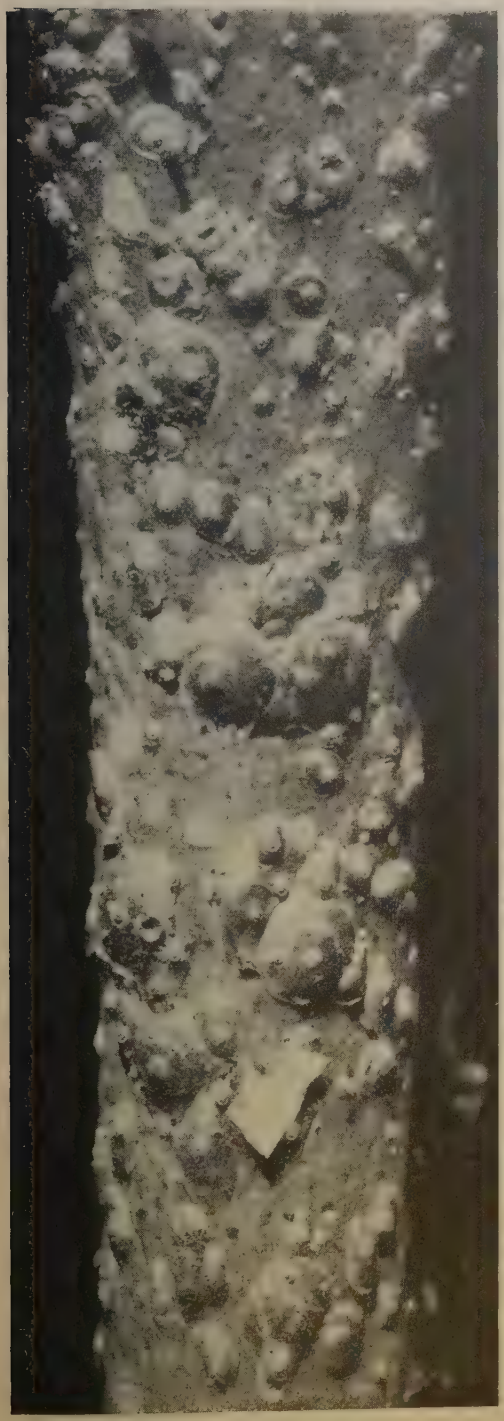
H

I

J

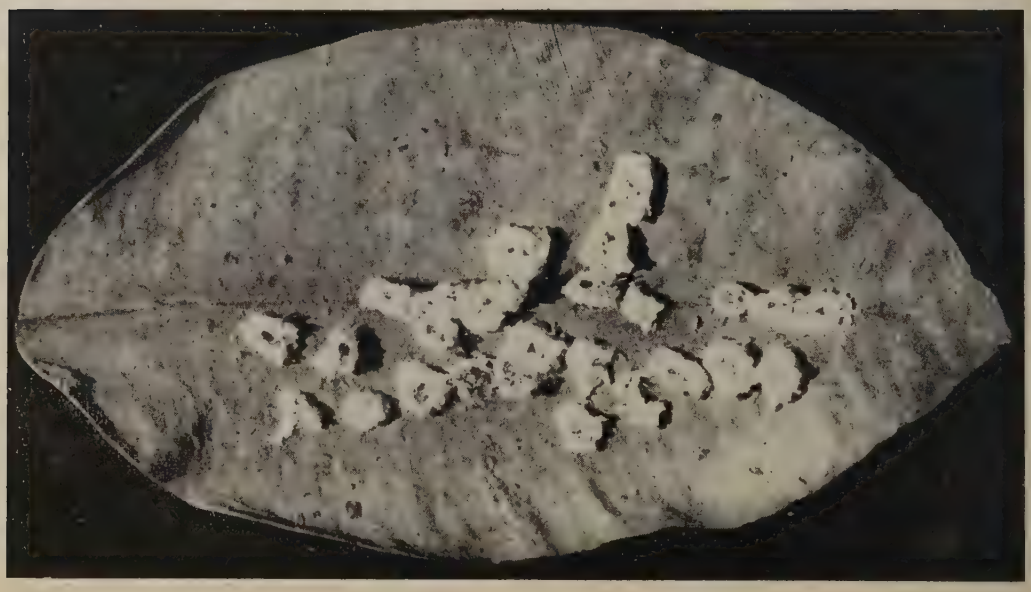
K

L



M

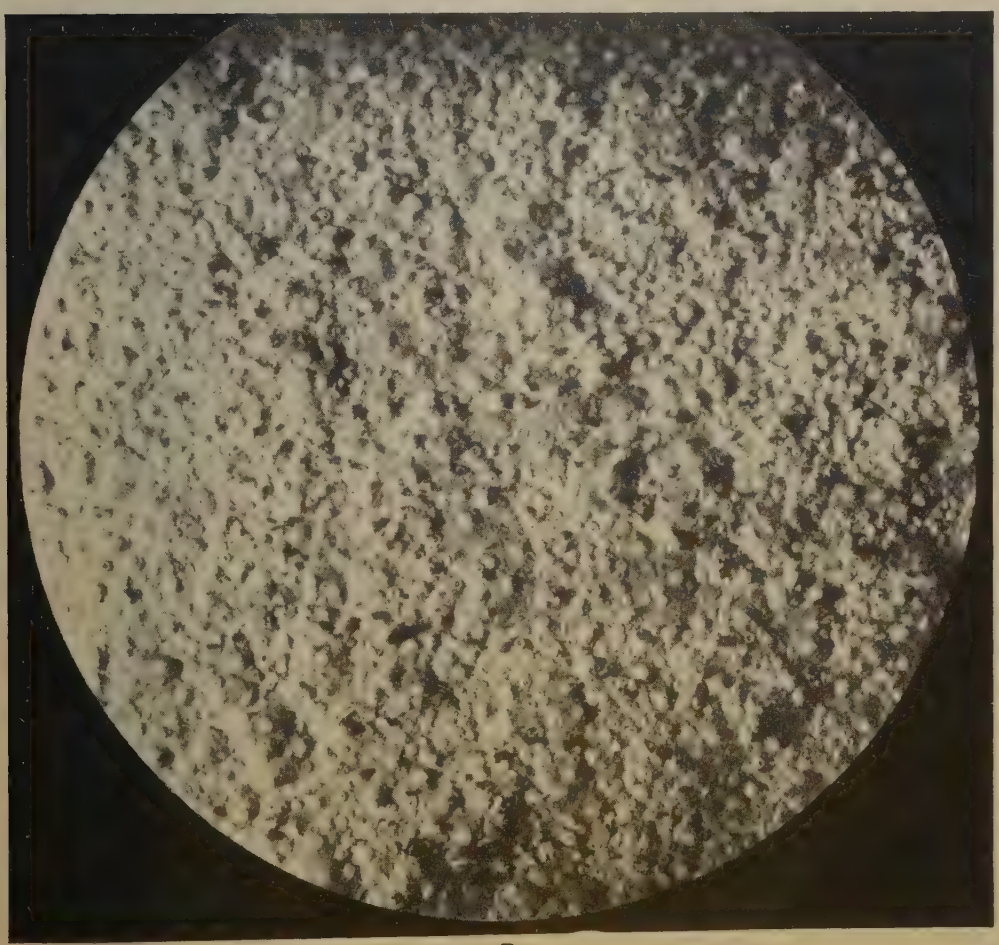
N



O

P

Q



R

Vol. 14 — Art. 23 Dezembro de 1943

NOTAS COCCIDOLÓGICAS
(HOMOPTERA - COCCOIDEA)

POR

H. S. Lepage e O. Giannotti

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 41 figuras no texto

Como tivessemos tido a oportunidade de examinar material típico de alguns diaspidideos da coleção do Departamento de Zoologia de S. Paulo, resolvemos fazer a redescrição de algumas espécies descritas por HEMPEL, cujas descrições não são completas, principalmente por não dispôr aquele grande coccidologista, na ocasião, de um desenhista que as ilustrasse e portanto preenchesse as lacunas da descrição.

Essas espécies, que serão estudadas neste trabalho são: *Aspidiotus pizai, Diaspis occultata, Diaspis australis, Chrysomphalus sitreanus e Aspidiotus jaboticabae,* que passarão a denominar-se *Pseudoparlatoria pizai* (HEMPEL), *Pseudoparlatoria occultata* (HEMPEL), *Pseudaulacaspis australis* (HEMPEL), *Targionia jaboticabae* (HEMPEL) e *Melanaspis sitreana* (HEMPEL).

Quanto às espécies de HEMPEL, *Aspidiotus pizai* e *Aspidiotus jaboticabae,* já FERRIS, em "Microentomology" vol. 6, 1941, — "The genus Aspidiotus" as classificara como indeterminadas na citada revisão do gênero.

Além dessas, trataremos de três espécies de *Aonidiella* que foram estudados pelo Prof. COSTA LIMA em 1924 *(Aonidiella arnaldoi* e *Aonidiella leivasi)* e 1934 *(Aonidiella saccharicola),* às quais esse autor, em sua obra "Insetos do Brasil" vol. III, pg. 289, se refere como pertencentes ao gênero *Melanaspis.*

Diz ainda o Prof. COSTA LIMA que as espécies *Melanaspis calcarata* e *Melanaspis obtusa,* descritas por FERRIS em 1941, no vol. III, do "Atlas of the Scale Insects of North America", parecem identicas a *A. leivasi* e *A. arnaldoi.* Comparando às descrições e desenhos, julgamos, entretanto, que sómente *Melanaspis calcarata* é perfeitamente idêntica a *A. leivasi,* havendo distinções visiveis entre *A. arnaldoi* e *M. obtusa.* Quanto a *A. saccharicola,* não ha duvida que é uma espécie bastante diferente de qualquer outra já descrita.

Iniciaremos o trabalho com a redescrição das cinco espécies de A. HEMPEL; em seguida daremos a descrição das espécies do Prof. COSTA LIMA; a seguir nos ocuparemos de duas espécies novas, uma do gênero *Melanaspis,* e uma do gênero *Conchaspis;* finalmente faremos

a descrição de *Protopulvinaria longivalvata* GREEN, pela primeira vez constatada no Brasil, e daremos uma nota sôbre a espécie *Pseudoparlatoria aberrans* LEPAGE, recentemente descrita.

Pseudoparlatoria pizai (HEMPEL), n. comb.

(Figs. 1-4)

Aspidiotus pizai HEMPEL, 1904, Bol. Agricultura, S. Paulo, 5: 320. — J. G. SANDERS, 1906, Catalogue of recently described Coccidae. Bull. U. S. Bur. Ent. Tech. Ser. 12 (1): 18. — H. S. LEPAGE, 1938, Catalogo dos Coccídeos do Brasil, Rev. Mus. Paul., 23: 296.

Material examinado: — Da coleção entomológica do Museu Paulista, registrado sob o n.º 16.300.

Caracteres — A descrição original dada por A. HEMPEL é a seguinte:

"O escudo da fêmea é oval, tendo a parte mais larga perto da extremidade posterior, convexo, de côr branco-escura até enegrecida. As peliculas são postas na extremidade anterior, e tem côr amarelo-clara. O escudo tem 1,6 mm de comprimento e de 1,1 mm de largura.

A fêmea é subcircular, com 0,82 mm de diâmetro, com derme mais ou menos rigida, de côr amarelo-clara. Há no pigídio três pares de lobulos, sendo o par mediano largo, com grande espaço entre os dois. O segundo e terceiro par tem dois lobulos cada um. A margem do pigídio é espessa e serreada entre o último par de lobos e o penúltimo segmento.

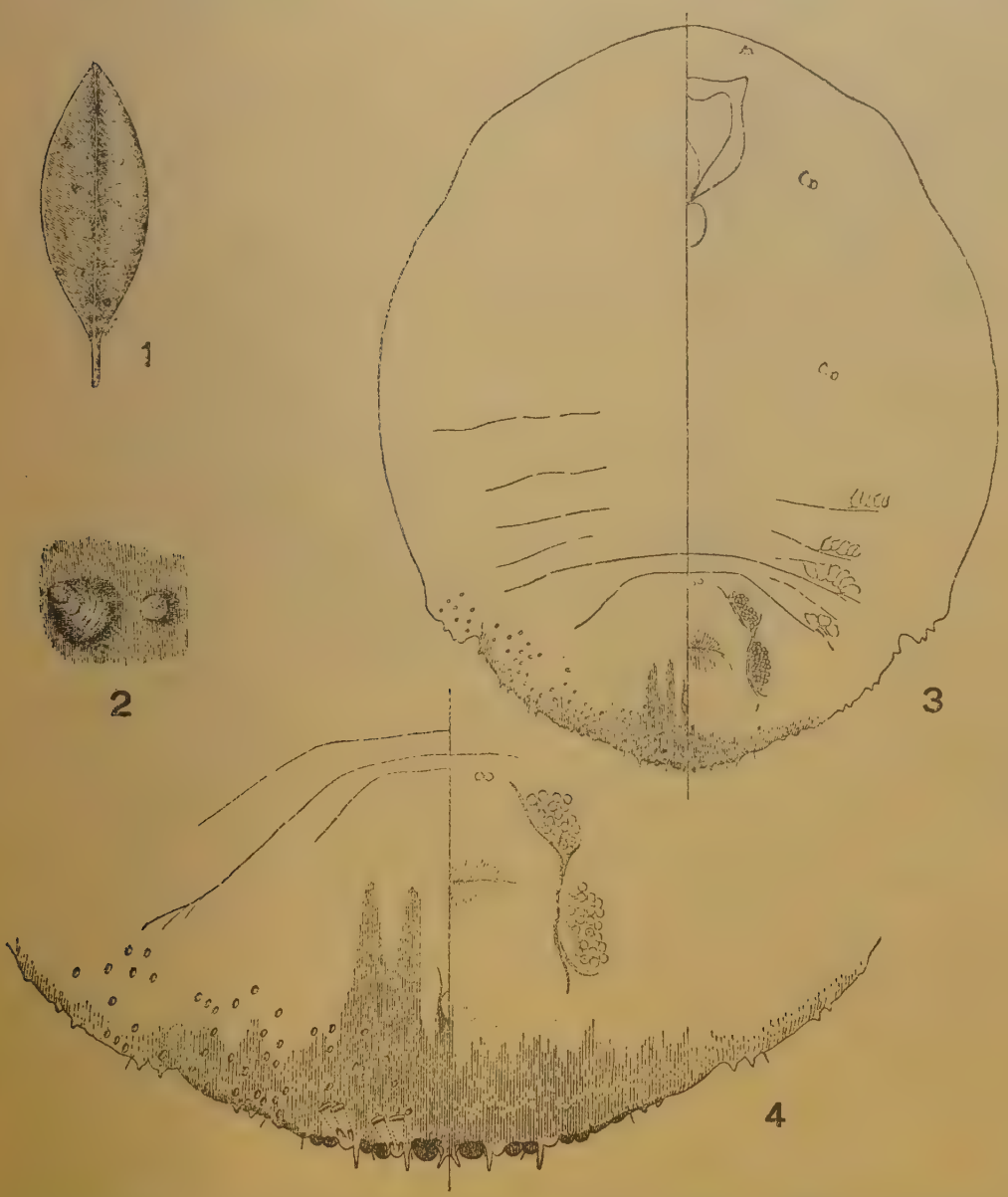
Entre os dois lobulos medianos há placas simples, e, na margem, entre os outros lobulos, há diversos pêlos curtos, simples, e aberturas de glândulas.

A margem, na base dos lobulos, é espessa, e de côr um pouco mais escura; existem, no pigídio, muitas aberturas grandes, ovais, de glândulas. Há quatro grupos de glândulas circungenitais, tendo as antero-laterais 25 a 39 glândulas cada um, e os posteriores laterais 31 a 35 glândulas cada um. Às vezes há também entre os grupos anteriores, de uma a cinco glândulas soltas".

A essa descrição acrescentaremos: ângulo apical do pigídio medindo cêrca de 170º. Os três pares de lobulos não possuem entalhes, notando-se apenas uma esclerose transversal na base dos lobulos medianos. Espinhos glandulares (= placas da descrição original) distribuidos entre os lobulos da maneira característica do gênero, isto é, um par entre os lobulos medianos, bifidos, e simplesmente um em cada espaço interlobular.

Macrodutos marginais dispostos da seguinte maneira: dois no primeiro espaço interlobular e dois no segundo espaço interlobular.

Dutos dorsais distribuidos proximo à margem do corpo, e, localizados não só no pigídio como também nos segmentos prépigidiais, alcançando o 3.º segmento abdominal. Anus relativamente grande e situado um pouco abaixo do centro do pigídio.



Pseudoparlatoria pizai (HEMPEL). Fig. 1 — Folha atacada, metade do tamanho natural; Fig. 2 — Escudos feminino e masculino aumentados; Fig. 3 — Fêmea adulta × 27; Fig. 4 — Pigídio da fêmea adulta × 130.

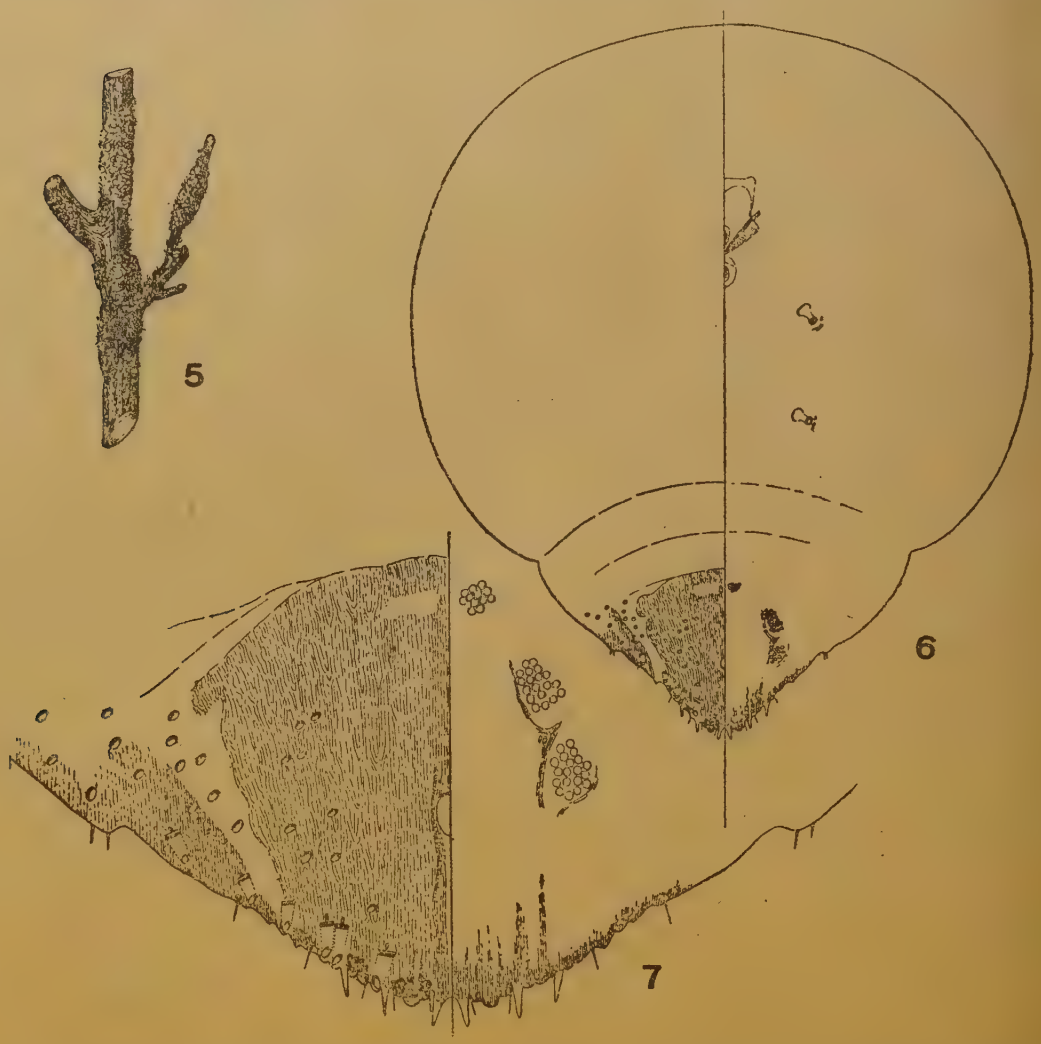
Nota: — Na conformação geral do corpo, esta espécie aproxima-se muito da *Pseudoparlatoria circularis* LEPAGE. Entretanto, pode ser facilmente separada pela forma e tamanho dos lobulos pigidiais, pelo número de macrodutos marginais, e pela localização e distribuição dos dutos dorsais.

Hosp. e distribuição: — Coletado no Est. do Rio de Janeiro, Itatiaia, sobre *Drimus* sp.. Localizam-se nas paginas inferio-

res das folhas, e acham-se dispostas, geralmente, perto da nervura mediana.

Pseudoparlatoria occultata (HEMPEL), n. comb.
(Figs. 5-7)

Diaspis occultata HEMPEL, 1937, Arch. Inst. Biológico, S. Paulo, 8: 28. — H. S. LEPAGE, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 405.



Pseudoparlatoria occultata (HEMPEL). Fig. 5 — Ramo atacado vendo-se o fungo que cobre o coccideo; Fig. 6 — Fêmea adulta × 23; Fig. 7 — Pigídio da fêmea adulta × 120.

Material examinado: — Da coleção entomológica do Instituto Biológico de S. Paulo, registrado sob o n.º 719.

Caracteres — A descrição original, à qual nada temos a acrescentar, é a seguinte:

"O escudo da fêmea tem a forma mais ou menos circular, com a superfície dorsal um pouco aspera e de côr parda, mas com a face interior de côr branca. O dorso é um pouco convexo. Os escudos maiores medem cêrca de 1,500 mm de diâmetro. Os indivíduos estão sempre localisados em baixo de uma camada espessa de feltro ou camurça formada pelo micelio de um fungo. O escudo do macho não foi encontrado. A fêmea adulta tem a côr branca, com o corpo cordiforme ou em forma de pião, medindo os exemplares maiores, depois de preparados, cêrca de 1,280 mm de comprimento e 1,140 mm de largura. O pigídio tem a extremidade posterior obtusa, e dois pares de lobulos bem visiveis; em certos exemplares parece ter mais um terceiro par, pois as margens do pigídio são um pouco chitinisadas e serrilhados. Os lobulos do primeiro par são largos e curtos, de forma triangular, com um pequeno entalhe em cada lado e são situados distantes um do outro. O segundo par tem os lobulos pequenos bifidos. Há entre os lobulos do primeiro par uma placa larga, grande e chata, a qual tem a extremidade bifida, formando dois apêndices grossos e cônicos.

Entre o primeiro e o segundo par de lobulos há uma placa simples e, na margem, além do segundo par, mais três placas simples, espaçadas umas das outras. Todas as placas têm a forma cônica e são muito mais compridas do que os lobulos. Nas margens laterais do pigídio há ainda duas pequenas saliências em cada lado, cada qual com uma ou duas pequenas placas terminais. No lado dorsal do pigídio, perto da extremidade, há ainda cinco pares de pêlos escuros, tão compridos como os lobulos, e colocados: um par entre o primeiro par de lobulos; um entre estes e o segundo par de lobulos; e os restantes mais além perto da margem e espaçados um do outro. Há cêrca de cem glândulas dorsais, tubulares, no pigídio; êste tem a derme, na parte mediana, chitinisada e finamente enrugada no sentido longitudinal. Há cinco grupos de glândulas perivaginais, tendo o grupo mediano de 7 a 11 glândulas; os grupos anterolaterais, de 16 a 22; e os posterolaterais de 16 a 20. Glândulas periestigmaticas não foram observadas. As antenas compõem-se de pequenos tubérculos, cada um com dois pêlos terminais, dos quais um é curto e outro comprido".

Hosp. e distribuição: — Encontrada em São Paulo, Capital, sobre *Bacharis* sp.

Pseudaulacaspis australis (Hempel), n. comb.

(Figs. 8-11)

Diaspis australis Hempel, 1900, Rev. Mus. Paulista, 4: 521. — H. S. Lepage, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 403.

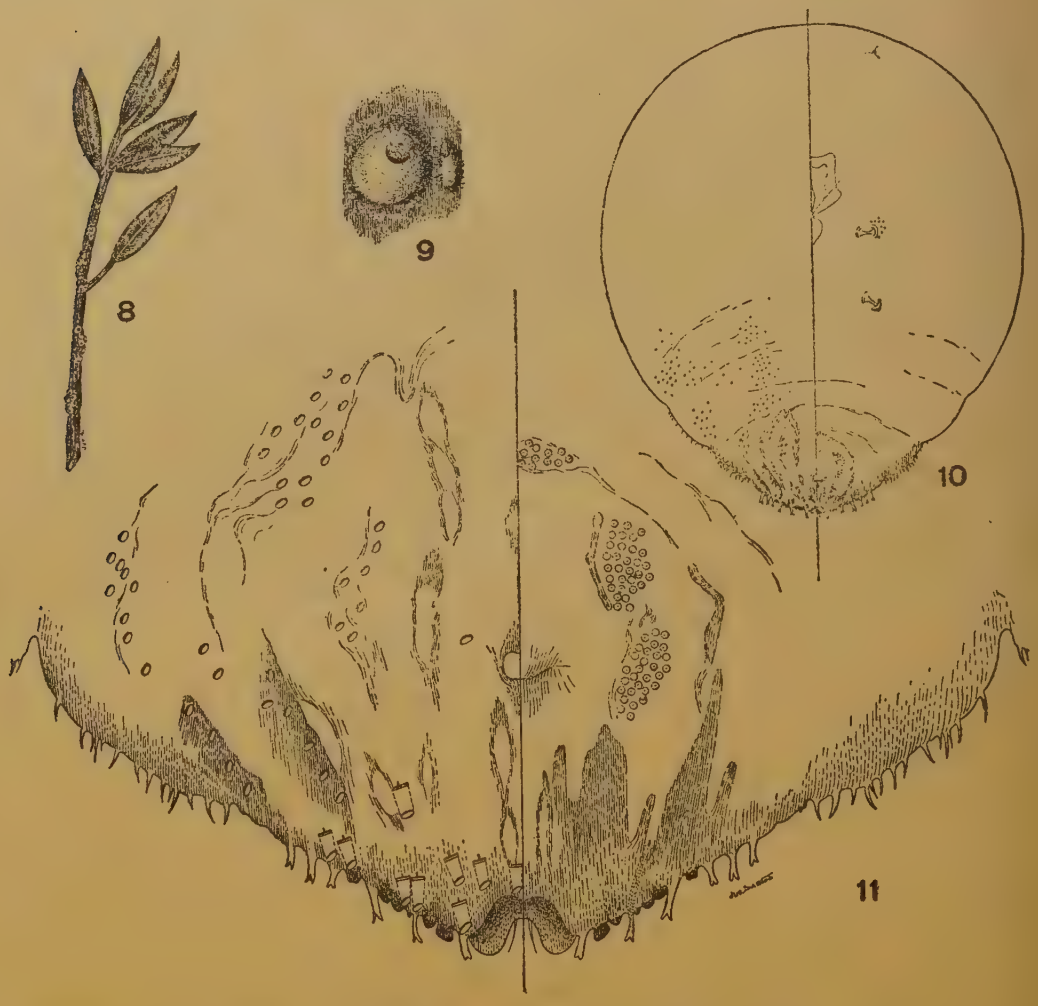
Material examinado: — Da coleção entomológica do Museu Paulista, registrado sob o n.º 15.720.

Caracteres — A descrição original é a seguinte:

"Escudo do adulto feminino, branco, opaco, oblongo até subcircular em contôrno, muito convexo, cêrca de 2,75 mm de comprimento. Peliculas pardo-claras, usualmente expostas, situadas perto da margem.

Escudo masculino branco, estreito, unicarinado formando um saco completo, inchado anteriormente e deprimido posteriormente. Pelicula pardo-clara. Comprimento 1,50 mm.

Adulto feminino amarelado, a extremidade posterior do abdomen pardo-claro, oval, mais larga anteriormente; os três segmentos prepigidiais avançados lateralmente. Pigídio com três pares le lobos. O par mediano longe, à parte, grande, as margens internas divergentes e inteiras ou finamente dentadas, as margens externas em parte unidas com a margem do corpo. O segundo par é curto e usualmente bilobado, mas as vezes trilobado. O terceiro par é bilobado. Há também dois pares de curtas projeções laterais, parecidas com dentes, além do terceiro par de lobos. Há uma placa grande, com extremidade incisa entre os lobulos medianos e o primeiro par, uma entre o primeiro e o segundo par, e de



Pseudaulacaspis australis (HEMPEL). Fig. 8 — Ramo atacado, metade do tamanho natural; Fig. 9 — Escudos masculino e feminino aumentados; Fig. 10 — Fêmea adulta × 21; Fig. 11 — Pigídio da fêmea adulta × 105.

duas a três depois do terceiro par; fora destas existem cêrca de vinte placas simples semelhantes a cones. O segmento próximo ao pigídio tem em cada lado cêrca de 22 dessas placas e o seguinte cêrca de 10. Entre os lobos medianos existem dois pêlos agudos. O pigídio e os segmentos abdominais têm numerosas glândulas tubulares, grandes, e também pequenas. As glândulas circungenitais existem em

5 grupos; o anteromediano tem de 15 a 28; os anterolaterais, de 17 a 45, e os posterolaterais, de 17 a 32. Ao redor do espiráculo anterior existem 20-25 fileiras redondas. A derme é transversalmente estriada e tem poucos pêlos curtos. As antenas existem em forma de tubérculos pequenos, com um pêlo".

A essa descrição apenas acrescentaremos que os dutos dorsais aparecem desde o pigídio até o primeiro segmento abdominal, e acham-se aproximadamente distribuidos em grupos submedianos e submarginais.

Além disso, os dutos marginais do pigídio, que são mais ou menos do mesmo tamanho que os dorsais, são distribuidos do seguinte modo: dois entre os lobulos medianos, um entre os lobulos medianos e o 1.º par, dois entre o 1.º e o 2.º par e de dois a três depois do 3.º par de lobulos. Ventralmente nota-se uma placa esclerosada larga, de forma irregular, e que atinge quasi o nível da abertura anal.

Hosp. e distribuição: — Coletados em São Paulo, Capital, nos ramos de um arbusto da familia *Myrtaceae*.

Targionia jaboticabae (Hempel), n. comb.

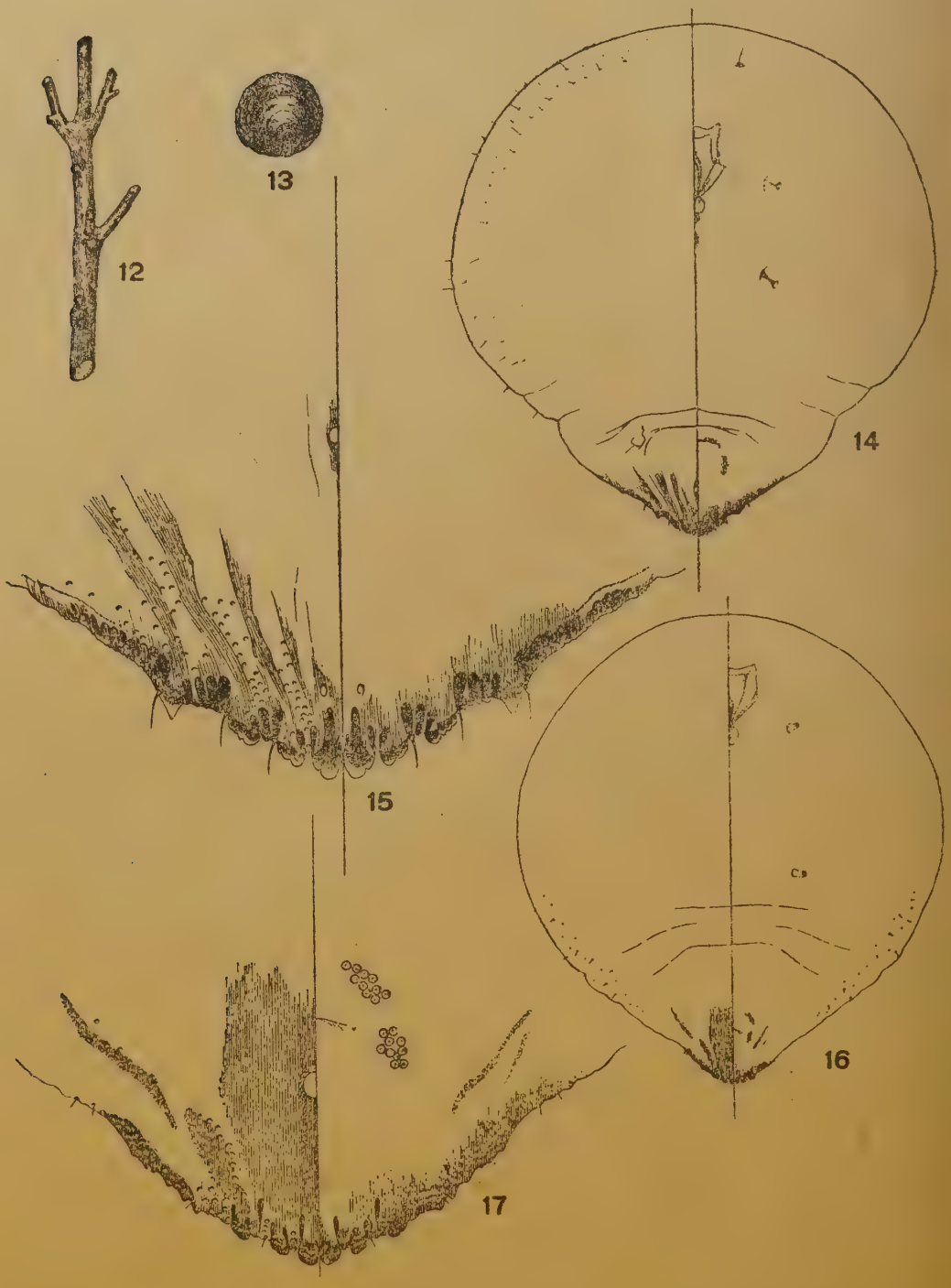
(Figs. 12-15)

Aspidiotus jaboticabae Hempel, 1918, Rev. Mus. Paulista, 10: 206-208. — H. S. Lepage, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 395.

Material examinado: — Da coleção entomologica do Museu Paulista, registrado sob o n.º 17.350.

Descrição original:

"O escudo da fêmea adulta é de forma circular a subcircular, duro e opaco, e variável, sendo uns mais convexos do que os outros, de côr pardo-escura, de chocolate, até preta. O interior do escudo está forrado com uma secreção branca. Frequentemente a superfície do escudo está coberta de pequenos pedaços de casca. As peliculas são cobertas e indicadas por uma pequena eminência perto da margem. A placa ventral é delgada, firme e aderente ao escudo dorsal. O diâmetro do escudo varia de 3 a 3,25 mm. A fêmea adulta tem a forma largamente oval, com a derme fina e transparente, tendo o corpo de 2 a 2,150 mm de comprimento. O pigídio é pequeno, com 4 pares de lobulos, sendo a margem crenulada e chitinizada. Os lobulos do 1.º par estão muito unidos, com a borda exterior com um entalho. O 2.º par é perto do 1.º com 2 entalhos na borda exterior. O 3.º par é situado um pouco anteriormente do 2.º par e tem 3 entalhos na borda exterior. O 4.º par é simples, sem entalho e está situado um pouco distante do 3.º par. Há 4 pares de espinhos, sendo o 1.º par situado entre o 2.º e 3.º par de lobos; o 2.º par entre o 3.º e o 4.º par de lobulos; o 3.º e o 4.º par na margem anteriormente do 4.º par de lobulos. Há 5 grupos de glândulas circungenitais, sendo geralmente os 2 grupos laterais de cada lado confluentes. O grupo mediano compõe-se de 10 a 11 glândulas e os laterais de 25 a 33. Há ainda um grupo de poros circulares de cada lado perto da margem posterior".



Targionia jaboticabae (HEMPEL). (Figs. 12-15). Fig. 12 — Ramo atacado, metade do tamanho natural; Fig. 13 — Escudo da fêmea aumentado; Fig. 14 — Fêmea adulta aumentada × 21; Fig. 15 — Pigídio da fêmea adulta × 105. *Melanaspis sitreana* (HEMPEL). (Figs. 16-17). Fig. 16 — Fêmea adulta × 21; Fig. 17 — Pigídio da fêmea adulta × 105.

Como vemos, nessa descrição não há absolutamente referência alguma a respeito da presença de paráfises, e da localisação dos dutos dorsais.

As paráfises, que são curtas e largas, acham-se distribuidas da seguinte maneira: uma em cada ângulo basal dos primeiros 3 pares de lobulos, uma no 2.º espaço interlobular, e de 3 a 4 no 3.º espaço interlobular. Depois do 4.º par a margem do pigídio apresenta-se chitinizada, e com uma série de escleroses que se parecem com um número grande de paráfises soldadas umas às outras. Os dutos dorsais são de pequeno diâmetro, longos e delgados, e suas aberturas localizam-se em sulcos bem definidos do dorso do pigídio.

Hosp. e distribuição: — Coletado em S. Manoel, Est. de São Paulo, sobre jaboticabeira.

Melanaspis sitreana (Hempel), n. comb.

(Figs. 16-17)

Chrysomphalus sitreanus Hempel, 1932, Rev. de Entomologia, S. Paulo, 2 (3): 337-338.

Material examinado: — Da coleção entomologica do Museu Paulista, sem numero.

Caracteres — Originalmente esta espécie foi descrita da seguinte maneira:

"O escudo da fêmea tem a forma subcircular ou oval, com 2 a 2,5 mm de diâmetro. As peliculas são excentricas, formando uma pequena eminência com o centro concavo e de côr cinzento-clara. A côr do escudo é cinzenta ou pardo-escura. Nas exemplares nos quais as peliculas haviam sido esfregadas, esta parte do escudo tem a côr preta. O escudo do macho tem a côr e a forma semelhante ao da fêmea, porém o tamanho é muito menor, não chegando a ter a metade do escudo da fêmea.

A fêmea adulta é relativamente grande, tendo cêrca de 1,380 mm de comprimento. A derme é finamente estriada transversalmente. As antenas são presentes como pequenos tubérculos, cada um com uma seda grande. Os espiráculos são grandes. O pigídio é largo, com três pares de lobos simples, dos quais os do terceiro par são os mais largos. A margem exterior de todos os lobos é denteada. Há seis pares de paráfises ou áreas claviformes e espessas, chitinosas, na base dos lobos sendo o segundo e o quarto par os mais compridos e sub-iguais em tamanho. Os outros quatro pares são também sub-iguais em tamanho. As paráfises são localizadas: num par na base do primeiro par de lobos, na parte externa; o segundo e terceiro par têm a sua origem na base do segundo par de lobos; o quarto par está situado entre o segundo e o terceiro par de lobos; e o quinto e sexto par têm a sua origem na base do terceiro par de lobos. O primeiro par de paráfises tem cêrca de 24 micra de comprimento; o quarto par 28 micra e os demais de 14 a 16 micra. Existem placas entre os lobos, mas a sua forma não pode ser descrita, visto terem a extremidade quebrada. Há 4 grupos de glândulas circun-

genitais localizados anteriormente da abertura anal. Os grupos anteriores compõem-se de 10 glândulas e os posteriores de 6 a 8. No pigídio há ainda numerosas glândulas filiformes com a extremidade anterior expandida, sendo as mais perto da margem, menores; e numerosos poros de forma oval. Na superfície da derme, especialmente perto das margens laterais, há diversos pequenos pêlos. A margem além do terceiro par de lobos é serrilhada".

Nesta descrição, o Sr. A. HEMPEL apenas não se referiu aos 3 pares de placas esclerosadas do dorso do pigídio, que são tipicas do gênero *Melanaspis*. Esta espécie tem essas placas muito bem definidas, notando-se ainda, nas margens internas do 2.º e 3.º par de placas, uma série de aberturas dos dutos dorsais.

Nota: — Esta espécie aproxima-se muito de *Melanaspis paulista*, da qual difere pelo contorno geral do corpo, pela forma e tamanho dos lobulos pigidiais e pelo comprimento das paráfises, que são nitidamente mais longas e delgadas em *Melanaspis paulista*.

Hosp. e distribuição — Coletado pelo Dr. WALTER HORN, em Cerro San Cristobal, Santiago, Chile, 26 de Outubro 1927, sobre *Sitrea caustica* HIERS.

Melanaspis arnaldoi (COSTA LIMA)

(Figs. 18-19)

Aonidiella arnaldoi COSTA LIMA, 1924, Almanack Agrícola Brasileiro, p. 139-140, figs. 5-7. — H. S. LEPAGE, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 392. — H. L. MC KENZIE, 1938, Microent. 3: 3.

Melanaspis arnaldoi (LIMA, 1924), A. DA COSTA LIMA, 1942, Insetos do Brasil, 3: 289, fig. 262.

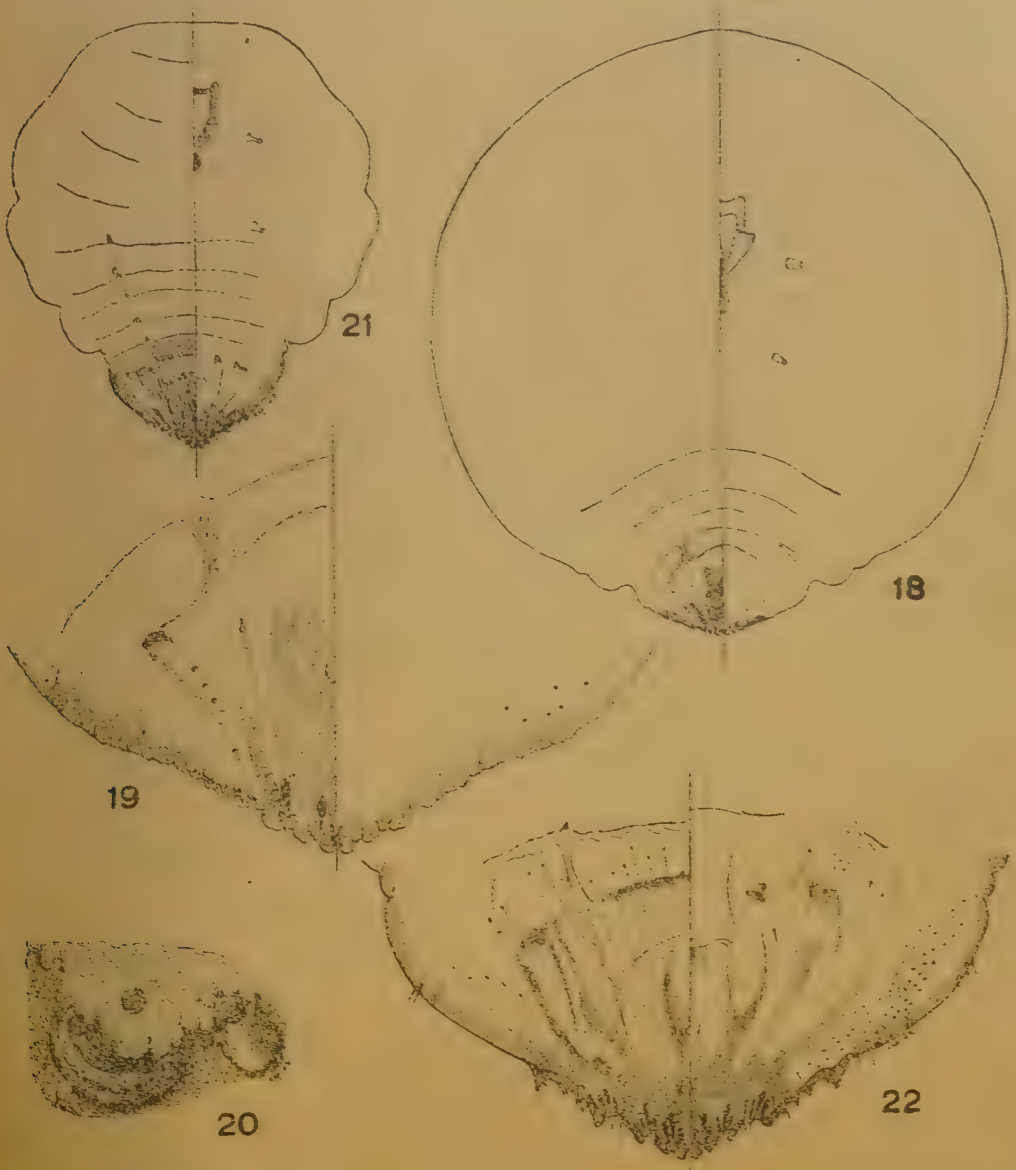
Material examinado: — Da coleção entomologica da Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro.

Caracteres — A descrição dada pelo Prof. COSTA LIMA é a seguinte:

"Foliculo da fêmea convexo, de côr cinzenta ou pardacenta escura, quasi negra, idêntica à da casca destacável que em geral o encobre, de superfície aspera, apresentando no centro, ou ligeiramente excentrica, a 1.ª exuvia ou pelicula larval de um negro brilhante. Pelicula ventral bem desenvolvida, especialmente na periféria, aderente à casca e apresentando a face interna revestida de cêra branca. Diâmetro, cêrca de 1 mm.

Fêmea de contôrno circular, piriforme ou turbinada e de côr amarela. Discos ciriparos totalmente ausentes. De cada lado da linha mediana, na margem do pigídio, há 3 lobulos bem desenvolvidos e, para fora deles, uma série de 4 outros, menos conspicuos. Os primeiros, ou medianos (palhetas) são os menores, apresentam o bordo distal arredondado e, perto da base, no bordo interno, um ligeiro entalhe. O segundo e terceiro convergem para a linha mediana, apresentam também o bordo apical arredondado, porém em ambos, há um entalhe no bordo externo, mais profundo no 2.º, e outro menos visível no lado interno. O 3.º lobulo

é de todos o mais desenvolvido. O 4.º é triangular, contiguo ao quinto e dêste separado por um sulco que mal se distingue. O 4.º tem a largura do 1.º, porém não é tão saliente. O 5.º, o 6.º e o 7.º são meras expansões chitinisadas de pigídio, subtriangulares, de extremidade arredondada, menos salientes que o 4.º. Verda-



Melanaspis arnaldoi (Costa Lima). (Figs. 18-19). Fig. 18 — Fêmea adulta × 23; Fig. 19 — Pigídio da fêmea adulta × 120. *Melanaspis leivasi* (Costa Lima). (Figs. 20-22). Fig. 20 — Escudos masculino e feminino aumentados; Fig. 21 — Fêmea adulta × 19; Fig. 22 — Pigídio da fêmea adulta × 110 (segundo Ferris, 1941).

deiras paráfises, isto é, espessamentos claviformes da chitina ao longo da margem do pigídio, há apenas 3, a saber: a 1.ª, a menor, que é um prolongamento de lado interno do 1.º lobulo, de cada lado de incisura mediana; a 2.ª, que emerge do fundo

da 2.ª incisura, tem cêrca de 2 vezes o comprimento da 1.ª; a 3.ª, que se origina da 3.ª incisura e é de todas a maior e a mais dilatada, apresenta a extremidade anterior situada muito além do nível em que se acha a cabeça da 2.ª paráfise. Além das paráfises há outros espessamentos da chitina no bordo do pigídio. Assim, a margem lateral se apresenta espessada desde a base da 4.ª incisura até pouco além do 7.º lobulo. Êsse espessamento é um tanto prolongado para adiante, ao nível da 4.ª incisura e na base do 4.º lobulo. As placas ou furcapectinae são pequenas e apenas visíveis nos exemplares fortemente corados. Apresentam-se bifurcadas na extremidade e, em comprimento, não excedem o comprimento dos lobulos. Acham-se dispostas do seguinte modo: 2 na incisura mediana, 2 na 2.ª incisura e 3 na 3.ª. Da margem do pigídio emergem 3 pequenos espinhos; cada um se acha implantado na parte dorsal dos 3 primeiros lobulos, perto da borda interna e ao nível da base respectiva. O anus está situado, aproximadamente, no meio do segmento pigidial".

Nesta descrição o Prof. COSTA LIMA não se referiu aos três pares de placas esclerosadas, do dorso do pigídio. Como na espécie *leivasi*, nas margens internas dos 2.º e 3.º pares de placas notamos uma série de 5 a 7 aberturas de dutos glandulares.

Hosp. e distribuição: — Encontrado no Rio de Janeiro sobre *Vitis* sp.

Melanaspis leivasi (COSTA LIMA)

(Figs. 20-22)

Aonidiella leivasi COSTA LIMA, 1924, Egatéa, 9: 195. — H. S. LEPAGE, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 392.

Aspidiotus (Aonidiella) leivasi COSTA LIMA, H. L. MC KENZIE, 1938, Microent., 3:3.

Melanaspis calcarata FERRIS, 1941, Atlas of the Scale Insects of North America, 3: 349.

Melanaspis leivasi (LIMA, 1924), A. DA COSTA LIMA, 1942, Insetos do Brasil, 3: 289.

Material examinado: — Da coleção entomologica da Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro.

Caracteres — A descrição dada pelo Prof. COSTA LIMA é a seguinte:

"Escudo da fêmea quasi circular, relativamente pouco robusto, mais ou menos convexo, de superfície aspera e de colorido cinzento-escuro, com as exuvias larvais excentricas mas não marginais, formando uma protuberância de côr negro-pixea. Véo ventral espessado na periferia, fino e esbranquiçado no meio e aderente à casca. Em geral, os escudos mais velhos são cobertos de um tenuissimo revestimento epidérmico do cortex da planta. Maior diâmetro do escudo 2 a 2,80 mm. Fêmea adulta de contôrno quasi circular, turbinado. Discos ciriparos pregenitais totalmente ausentes. Quatro pares de lobulos: os medianos (palhetas) arredondados posteriormente e estreitando-se em ponta para deante, apre-

sentam um entalhe mal perceptivel no bordo interno e outro mais profundo no bordo externo; os demais lobulos são mais ou menos triangulares e denteados na margem externa, sendo que o quarto apresenta também um dente agudo junto da base. A margem interna do 2.º e do 4.º não apresenta o entalhe, embora não muito conspicuo, que se observa no 3.º par. A margem interna do 4.º lobulo é reta, enquanto que nos demais é mais ou menos curva. Dêstes lobulos é o 4.º o mais desenvolvido. Para fora do 4.º lobulo a margem do pigídio se apresenta espessada e com prolongamentos lobuliformes ponteagudos, a saber: 3 pequenas pontas agudas para fora e para diante do 4.º lobulo e ainda, para diante, um grande prolongamento pouco mais ou menos do mesmo tamanho do 4.º lobulo, porém de bordos não serrados ou, quando muito, com o bordo interno ligeiramente entalhado. Paráfises (partindo do eixo longitudinal do corpo para fora); uma no prolongamento do bordo externo do lobulo mediano (1.º lobulo); outra menor no prolongamento do bordo externo do 2.º lobulo; 3 em relação com a 3.ª incisura, sendo a do meio maior que as que lhe são adjacentes e mais ou menos do mesmo tamanho da primeira que assinalei; 3 ou 4 em relação com a 4.ª incisura, pouco mais ou menos do mesmo tamanho, curtas e espessas, sendo a mais interna distintamente claviforme. Além destas, nota-se em alguns exemplares, uma ou duas paráfises curtas, destacando-se do espessamento da margem lateral do pigídio. Incisura mediana e 2.ª incisura aparentemente desprovidas de placas. Nos exemplares fortemente corados, vê-se, com forte aumento, ao nível da 3.ª incisura, 2 pequenas placas aparentemente bifurcadas. Vê-se também uma placa maior, simples, no fundo da 4.ª incisura. Há apenas 5 pares de espinhos bem visíveis; os 2 primeiros pares estão situados respectiva e imediatamente para fora do 2.º e 3.º pares de lobulos. O 3.º par visível, emerge do espaço compreendido entre o 4.º lobulo e o 1.º prolongamento marginal do pigídio. Os espinhos dorsal e ventral dêste par, como os do par que lhe fica dianteiro e que ainda não assinalei, são bem mais distantes um do outro que os 2 primeiros pares. Os do 4.º par ficam imediatamente para fora do último prolongamento lateral do pigídio e são recurvados na ponta. Finalmente os do 5.º par, situados no mesmo nível, são também recurvados e se inserem a meio da distância daquele último prolongamento ao estrangulamento que separa o pigídio do resto do abdomem. Fenda oval longitudinal, situada um pouco para traz do meio do pigídio. Fenda vulvar de contôrno quasi circular, localizada a meio da distância da base do pigídio à uma linha imaginária transversal passando pelo anus.

Diâmetro longitudinal — 1,50 mm a 1,70 mm".

Também nesta espécie, os três pares de placas esclerosadas do dorso do pigídio não foram referidos pelo autor. Nota-se, ainda, ao longo da margem interna do 2.º par de placas, uma série de cêrca de 6 a 8 aberturas de dutos glandulares. Ventralmente, notamos apenas uma zona marginal onde existem grande número de pequenos dutos.

Hosp. e distribuição: — Encontrada em Pelotas (Est. do Rio Grande do Sul) e Bahia sôbre *Vitis* sp. e *Ficus* sp. — Coletado por G. F. Ferris, no México sôbre *Ficus* sp. e *Bursera* sp. e na República do Panamá sôbre hospedeiro indeterminado.

Melanaspis saccharicola (Costa Lima) (Figs. 23-25)

Aonidiella saccharicola Costa Lima, 1934, O Campo, 5 (11): 25, 4 figs. — H. S. Lepage, 1938, Catalogo dos Coccideos do Brasil, p. 392. — H. L. Mc Kenzie, 1938, Microent. 3: 4.

Melanaspis saccharicola (Lima, 1934), A. da Costa Lima, 1942, Insetos do Brasil, 3: 289, fig. 261.

Material examinado: — Da coleção entomológica do Serviço de Defesa Sanitária Vegetal, do Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.

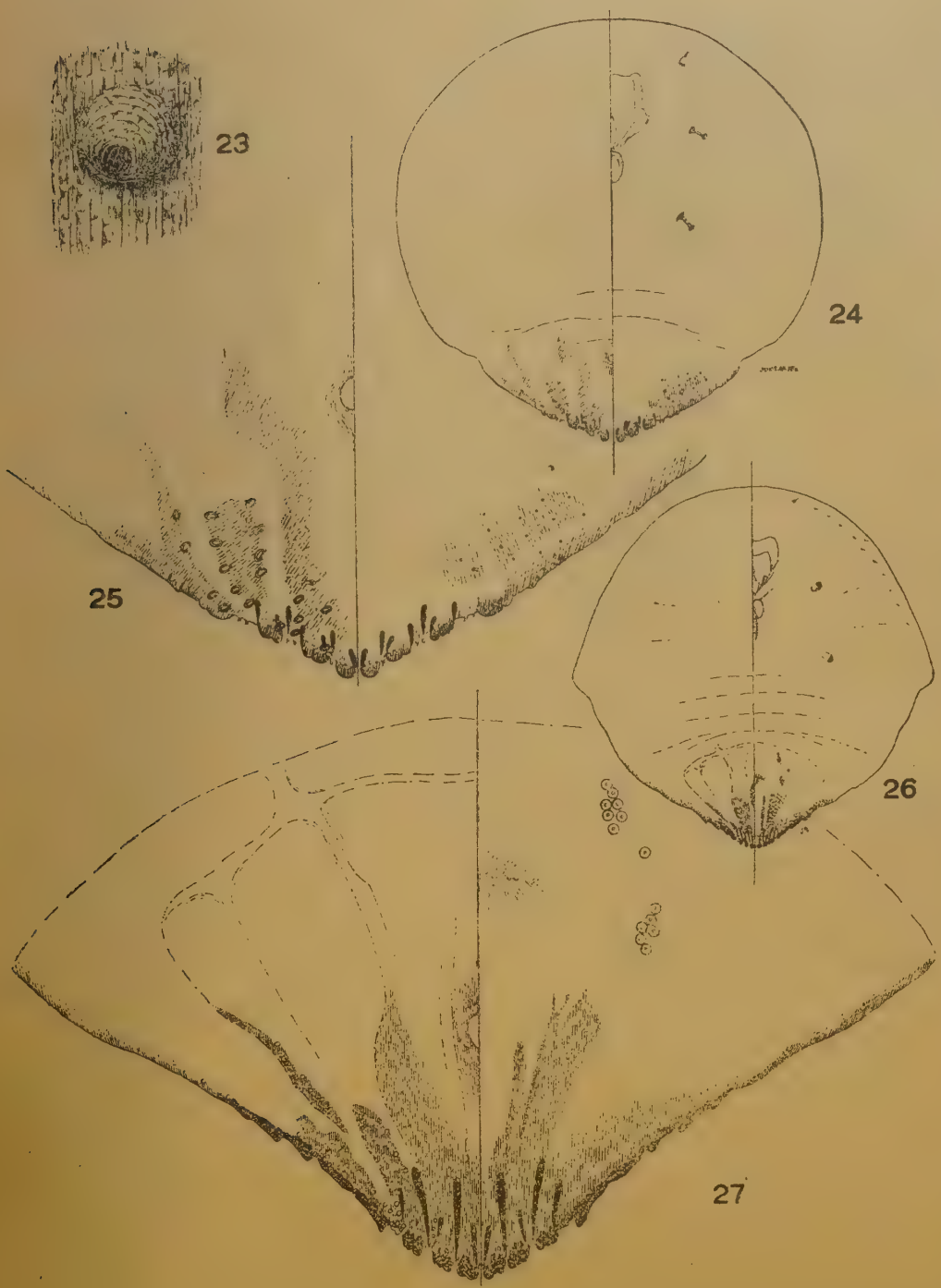
Caracteres — O Prof. Costa Lima, descreveu-a da seguinte maneira:

"Fêmea adulta — Caracteres do pigídio — 3 pares de palhetas. As medianas, as mais desenvolvidas, pouco salientes, arredondadas no apice e sem entalhes; 1.º par de palhetas laterais ainda menos salientes, convergindo para a linha mediana do corpo, simples ou com um entalhe pouco profundo; 2.º par de palhetas laterais representadas por uma ligeira saliência da margem pigidial, mais ou menos denticulada. Para fora do 2.º par de palhetas ainda se nota uma saliência quasi imperceptivel do bordo pigidial. Na incisura mediana, nas 2 incisuras laterais e para fora da 3.ª palheta lateral há um par de placas *(squamae)* muito delgadas, pequenas, relativamente largas e aparentemente truncadas no apice, sómente visiveis nas preparações fortemente coradas. Uma cerda fraca perto da base e do lado externo de cada palheta. Vulva pouco distinta; não há discos civiparos perivulvares. Anus circular, relativamente grande, situado no meio do pigídio. Glândulas sericiparas numerosas, e paráfises relativamente curtas, como se pode vêr na figura. Foliculo feminino quasi circular, robusto; exuvia larval mais ou menos excentrica, de côr negra, contrastando com a côr cinzenta do resto do foliculo; véo ventral desenvolvido, porém não espesso. Diâmetro do foliculo: de 1500 a 1800 μ".

A essa descrição, acrescentaremos: — Na base dos lobulos e nos espaços interlobulares aparecem 7 pares de paráfises curtas, todas mais ou menos do mesmo tamanho e assim distribuidas: um par no ângulo basal interno dos lobulos medianos, um par no primeiro espaço interlobular, um par em cada ângulo basal do 2.º par de lobulos, um par no 2.º espaço interlobular, e finalmente um par em cada ângulo basal do 3.º par de lobulos.

Placas esclerosadas no dorso do pigídio, muito bem definidas, notando-se nas margens internas e externas do 2.º par e na margem externa do 3.º par as aberturas dos dutos dorsais, que são de diâmetro relativamente grande.

Hosp. e distribuição: — Encontrada no Distrito Federal, sobre *Saccharum officinarum* L. e *Pennisetum purpureum* Schum.



Melanaspis saccharicola (Costa Lima). (Figs. 23-25). Fig. 23 — Escudo feminino aumentado; Fig. 24 — Fêmea adulta × 23; Fig. 25 — Pigídio da fêmea adulta × 110. *Melanaspis bondari*, sp. n. (Figs. 26-27). Fig. 26 — Fêmea adulta × 23; Fig. 27 — Pigídio da fêmea adulta × 110.

Melanaspis bondari, sp. n.
(Figs. 26-27)

Caracteres: — Escudo da fêmea adulta de côr cinzento-clara, com cêrca de 1,9 mm de diâmetro. Exuvias mais ou menos excentricas, de côr negra brilhante.

Fêmea adulta de contôrno arredondado, apresentando mais ou menos na altura dos estigmas posteriores dois tubérculos levemente esclerosados. Derme transparente, a não ser o pigídio, que tende a ser esclerosado. Numerosos espinhos acham-se esparsos em uma zona submarginal do corpo. Pigídio com 3 pares de lobulos, todos mais ou menos do mesmo tamanho e largura. Lobulos medianos com um entalhe na margem externa e os do 2.º e 3.º par com 2 entalhes. Depois do 3.º par, o pigídio apresenta-se bem esclerosado e nota-se uma série de 3-4 saliências que vão diminuindo de tamanho à medida que se afastam da linha mediana do corpo. Cinco pares de paráfises bem desenvolvidas, e distribuidas da seguinte maneira: um par no ângulo basal interno dos lobulos medianos, um par no 1.º espaço interlobular, um par no ângulo basal externo dos lobulos do 2.º par, um par no 2.º espaço interlobular e finalmente um par no ângulo basal externo dos lobulos do 2.º par. As maiores paráfises são as que se localizam nos espaços interlobulares, e têm um comprimento de cêrca do dobro das outras paráfises. Placas esclerosadas do dorso bem definidas, tendo o 2.º e 3.º par, uma série de 3 a 4 aberturas de dutos glandulares ao longo de suas margens internas. Além desses dutos notam-se outros na base do 1.º par de placas ou no 2.º espaço interlobular, na base do 2.º par de placas e ao longo da margem esclerosada do pigídio. Abertura anal grande, oval, situada mais ou menos no centro do pigídio, ventralmente; distingue-se uma esclerose larga que atinge mais ou menos o nível da abertura anal. Poros perivulvares presentes em 4 grupos.

Hosp. e distribuição: — Coletado pelo Sr. G. BONDAR, em 9-3-1943, na Bahia, sôbre planta não determinada. Localisa-se na pagina superior das folhas dessa planta. A esse ilustre entomologista dedicamos a presente espécie.

Material típico — Incorporado à coleção entomológica do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura de S. Paulo.

Conchaspis diplothemii, sp. n.
(Figs. 28-34)

Caracteres: — Escudo da fêmea adulta mais ou menos circular, branco-acinzentado pouco convexo, medindo em média 3,2 mm de diâmetro. Escudo ventral de côr branca, aderente ao hospedeiro.

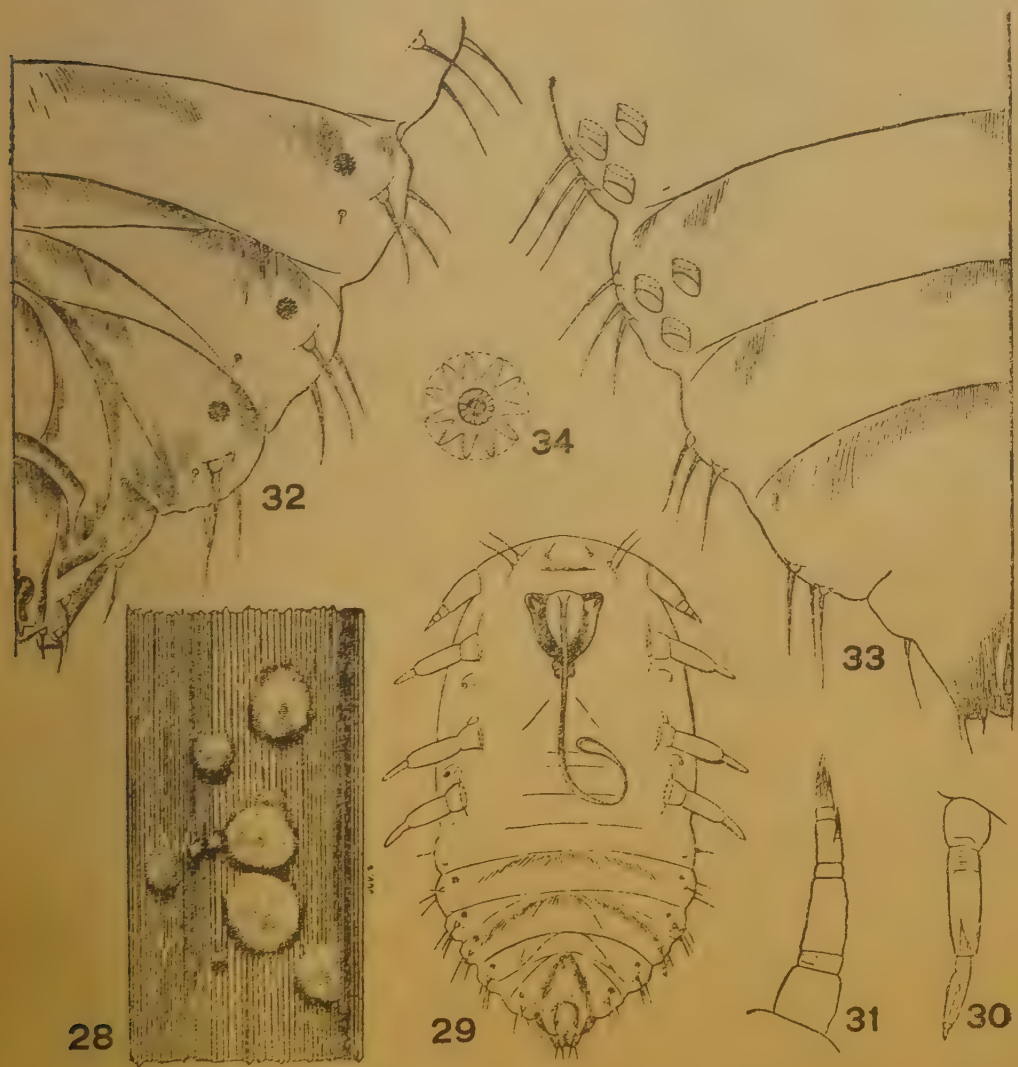
Ao levantarmos o escudo notamos sob êle vários pequenos puparios dos machos, alongados, em número de 2 a 8, dispostos radialmente e medindo cada um em média 1,5 mm de comprimento por 0,7 mm de largura, brancos, feltrosos.

Juntamente com os puparios masculinos encontramos sob êsse escudo, inteiramente formado de secreção, uma fêmea adulta e algumas formas larvais.

A fêmea adulta tem em média 1 mm de comprimento; tem o corpo ovalado e é de côr amarelo-alaranjada, deprimida, com segmentação muito nitida. Cabeça arredondada, com antenas situadas lateralmente. Antenas de 4 segmentos. Nos dois segmentos terminais notamos respectivamente 1 e 4 pêlos. Na face ventral

da cabeça notam-se de cada lado 3 pêlos colocados em linha. Olhos globosos, situados nas margens da cabeça. Rostrum bi-articulado.

Patas curtas situadas próximo das margens do corpo, mais ou menos iguais. Suturas tibio-dorsais obsoletas. Próximos às inserções das pernas encontramos os estigmas traqueais bem desenvolvidos. Abdomen arredondado, com a estremidade terminal em ponta. Segmentação nitida dos segmentos abdominais, com exceção dos 4 últimos segmentos, que são mais ou menos ligados, formando uma espécie de p s e u d o p i g í d i o. Êstes segmentos, embora perfeitamente distinguiveis, tomam a forma de placas triangulares mais chitinizadas. No segmento caudal encontramos 4 pêlos maiores e 4 pequenos.



Conchaspis diplothemii, sp. n. (Figs. 28-34). Fig. 28 — Folha atacada, metade do tamanho natural; Fig. 29 — Fêmea adulta; Fig. 30 — Perna; Fig. 31 — Antena; Figs 32 e 33 — Extremidade abdominal da fêmea adulta, vistas ventral e dorsalmente; Fig. 34 — Glândula multilocular da fêmea adulta.

Na face ventral, em cada um dos 5 segmentos que precedem ao terminal encontramos, uma glândula multilocular, como mostra o desenho, com 13 loculos. Na face dorsal encontramos formações glandulares cilíndricas com a disposição e forma constantes do desenho que ilustra esta descrição.

Nas margens dos segmentos, encontramos pêlos longos em número de 2 a 4 por segmento.

Vulva situada no ponto de radiação das placas triangulares abdominais, que constituem os últimos segmentos abdominais.

As larvas apresentam o mesmo aspéto das fêmeas adultas, sendo porém de menores dimensões.

Os machos são encontrados em grande quantidade e não apresentam diferenças das demais espécies dêste gênero.

Nota: — Esta espécie parece-se com *C. socialis* GREEN, da qual se distingue pela forma do escudo, que é em *C. diplothemii* muito pouco convexo; pela forma do corpo, que em *C. socialis* apresenta uma constrição logo depois do torax, e pela disposição e número das glândulas abdominais dorsais e ventrais.

Hosp. e distribuição: — Coletado pelo entomologista G. BONDAR, em V-941, na Bahia, sôbre *Diplothemium candescens* MART., vulgarmente conhecida por Buri ou Imburi.

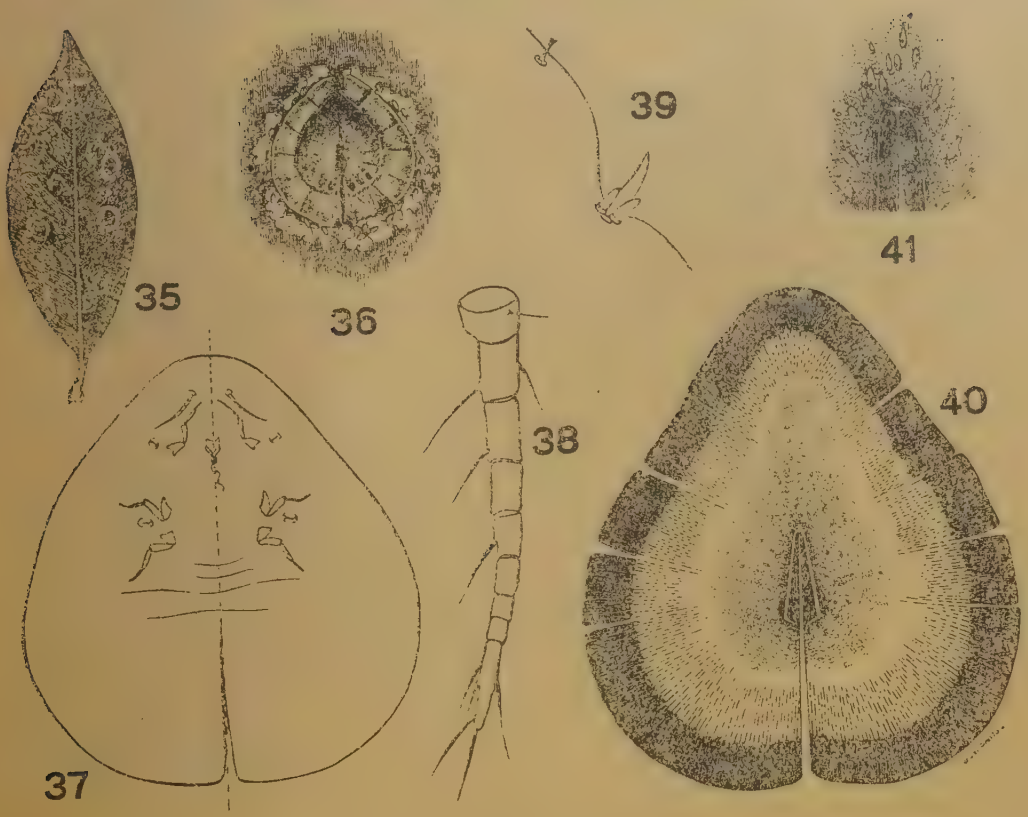
Material típico — Incorporado às coleções entomológicas do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura e Departamento de Zoologia de S. Paulo e Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

Protopulvinaria longivalvata GREEN
(Figs. 35-41)

1922. The Coccidae of Ceylon, 2: 254.

Caracteres: — Fêmea adulta piriforme, chata, com obscuras estrias radiando do centro para a margem. Ovissaco representado externamente apenas por uma estreita franja de secreção cotonosa, localizada ao redor do corpo. Acompanhando o contôrno da margem e situada aproximadamente entre o centro e a margem do corpo, notamos uma estria inconspicua. Côr geral vermelho-ocracea, tendendo para o castanho na área mediana do torax e na zona marginal. Comprimento variando de 2,25 a 3,50 mm e largura de 2,25 a 3 mm.

O escudo anal castanho, central, com a extremidade anterior alcançando aproximadamente o mesmo nível da inserção das patas medianas; notavelmente longo, seu comprimento atingindo cêrca de ¼ do inseto inteiro. Antenas com 8 segmentos, sendo o 3.º e o 8.º os mais longos e mais ou menos do mesmo tamanho. Fenda estigmática com 3 espinhos, tendo o mediano um pouco mais do que duas vezes o comprimento dos laterais. Pêlos marginais distribuidos em toda a volta do corpo e terminalmente franjados. Células dermais de forma oval, bem nítidas na zona marginal escura e pouco visiveis na área mediana.



Protopulvinaria longivalvata GREEN. (Figs. 35-41). Fig. 35 — Folha atacada, metade do tamanho natural; Fig. 36 — Fêmea em estado natural aumentada; Fig. 37 — Fêmea adulta, parte ventral × 23; Fig. 38 — Antena × 100; Fig. 39 — Espinhos da fenda estigmática × 100; Fig. 40 — Fêmea adulta, parte dorsal × 23; Fig. 41 — Extremidade anterior das placas anais × 100.

Hosp. e distribuição: — Coletado pelo Sr. B. L. RIBEIRO, em X-943, Campinas, Est. São Paulo, sôbre folhas de Jasmim e Abacateiro *(Persea gratissima* GAERTN.).

Velataspis aberrans (LEPAGE), n. comb.

Pseudoparlatoria aberrans LEPAGE, 1942, Arq. Inst. Biologico, S. Paulo, 13: 176-178, figs. 17-21.

No trabalho publicado por LEPAGE nos "Arquivos do Instituto Biológico" de 1942, denominado "Descrição de onze espécies novas de Coccideos do Brasil", foi descrita a espécie *Pseudoparlatoria aberrans*. Um exame mais cuidadoso das laminas e a comparação dos caracteres dessa espécie com os do gênero *Velataspis* FERRIS, revelou que é mais acertada a inclusão dessa espécie no citado gênero de FERRIS.

Portanto, a espécie *Pseudoparlatoria aberrans* LEPAGE, passará a denominar-se *Velataspis aberrans* (LEPAGE).

NOTES ON SOME COCCOIDEA (HOMOPTERA)

Abstract

In the present paper, twelve species of the superfamily Coccoidea have been studied, of which, ten are Diaspididae, one Conchaspidae and one Coccidae.

Among the Diaspididae, four belong to the tribe Diaspidini and six to the tribe Aspidiotini. In this last tribe, a new species has been described, Melanaspis bondari, from Bahia, Brazil.

Of the family Conchaspidae, a new species has been described, Conchaspis diplothemii, also from Bahia, Brazil; and finally the species Protopulvinaria longivalvata GREEN *— Coccidae — by the first time noted in Brazil, State of S. Paulo, was described.*

BIBLIOGRAFIA

FERRIS, G. F. — 1937-1942 — *Atlas of the scale insects of North America*, Stanf. Univ. Pr. Cal., 1: 108-109, 116-117; 2: 266-268; 3: 316-319, 347-368; 4: 414-421, 429-431.

FERRIS, G. F. — 1941 — The genus Aspidiotus. *Miroentomology*, 6 (2).

GREEN, E. E. — 1922 — The Coccidae of Ceylon. 2: 254.

HEMPEL, A. — 1900 — As Coccidas brasileiras. *Rev. Mus. Paulista*, S. Paulo, 4: 365-537.

HEMPEL, A. — 1904 — Resultado do exame de diversas coleções de coccidas. *Bol. Agric.*, S. Paulo, 5: 311-328.

HEMPEL, A. — 1918 — Descrição de sete novas espécies de coccidas. *Rev. Mus. Paulista*, S. Paulo, 10: 195-208.

HEMPEL, A. — 1932 — Descrição de vinte e duas espécies novas de Coccídeos, *Rev. Ent.*, S. Paulo, 2: 310-339.

HEMPEL, A. — 1937 — Novas espécies de Coccídeos do Brasil. *Arch. Inst. Biologico*, S. Paulo, 8: 5-36.

LEPAGE, H. S. — 1938 — Catalogo dos Coccídeos do Brasil. *Rev. Mus. Paulista*, S. Paulo, 23: 327-491.

LEPAGE, H. S. — 1942 — Descrição de onze espécies novas de Coccídeos do Brasil, *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 13: 173-189.

LIMA, A. DA COSTA — 1924 — Sôbre duas espécies de Coccídeos do gênero Aonidiella ainda não assinaladas no Brasil. *Egatea*, 9: 195-197.

LIMA, A. DA COSTA — 1924 — Sôbre insetos parasitos da videira. *Almanak Agric. Brasileiro*, Ed. Chac. e Quint., S. Paulo, p. 139-140.

LIMA, A. DA COSTA — 1934 — Um novo Coccídeo da cana de açucar. *O Campo*, Rio de Janeiro, 5 (11): 25.

LIMA, A. DA COSTA — 1942 — *Insetos do Brasil.* Esc. Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, 3: 286-289.

MC KENZIE, L. H. — 1938 — The Genus Aonidiella. *Microentomology*, 3: 1-36.

SANDERS, J. G. — 1906 — Catalogue of recently described Coccidae. *Bull. U. S. Bur. Ent.*, Tech. Ser. 12 (1): 18.

Vol. 14 — Art. 24 Dezembro de 1948

MÉTODOS DE LABORATÓRIO PARA OBSERVAÇÃO E CRIAÇÃO DE "DIATRAEA SACCHARALIS (FABRICIUS, 1794)", A BROCA DA CANA

POR

J. Bergamin

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com a estampa 31

Publicamos estas linhas para descrever o que temos feito para observar, em laboratório, o desenvolvimento da broca da cana, *Diatraea saccharalis* (FABR.).

Sabemos todos que a lagarta de *Diatraea* vive no interior de uma galeria por ela aberta no colmo da cana. Ao eclodir do ovo, geralmente posto sôbre a página dorsal da folha, desce a lagarta até a bainha, nela penetrando e dela alimentando-se até a primeira muda. Só depois procura perfurar o colmo, fazendo-o quasi sempre na gema ou na região que fica imediatamente acima do nó. Depois de penetrar, só ocasionalmente vemos a lagarta abandonar a galeria, e quando o faz, é para subir entre o colmo e a bainha e perfurar em qualquer dos gomos apicais, sempre mais moles. Todo o estádio larval contudo, é passado no interior do colmo. Seria, pois, dificil estudar êsse estádio, sem uma técnica apropriada, sem um método claro e de fácil execução. No campo, em canas em pé, é impossivel tal observação. Só em laboratório, criando-se um ambiente adequado, podemos estudar e anotar os fatos e hábitos da lagarta.

Para a obtenção de ovos, em laboratório, colocamos um casal de mariposas em manga ou em placa de vidro ou ainda em pequeno viveiro de criação, com pedaços de folhas de cana no interior. No dia seguinte, ou dois dias depois, há sôbre as folhas e sôbre as paredes do ambiente cêrca de 200 a 300 ovos. Cêrca de oito dias depois, eclodem as lagartas.

O método que imaginámos e utilizámos para observar o desenvolvimento larval é o seguinte: em uma tábua fina de madeira, de 1 a 2 mm de espessura, 77 mm de comprimento e 26 mm de largura, abrimos um orifício circular de 22 mm de diâmetro e em seguida, no sentido do comprimento, uma ranhura de 20 mm de comprimento por 3 mm de largura, abrangendo toda a espessura da tábua. Essa ranhura serve de abrigo à lagarta, antes que comece a penetrar na secção de cana que se coloca no orifício circular. A secção, que não deve ser cortada dos gomos velhos, mas do 2.º ou 3.º apicais, deve ter a mesma espessura da tábua. Para introduzir a lagarta a ser obser-

vada, procedemos da seguinte maneira: colocamos a placa de tábua sôbre uma lâmina de vidro (lâmina de preparação microscópica), introduzimos a secção de gomo no orifício circular e, por meio de um pincel de pêlo fino, umidecido, apanhamos uma lagarta recem-nascida, do interior da manga ou da placa onde foram postos os ovos, colocando-a na parede da ranhura. Cobre-se tudo com outra placa de vidro. O conjunto é mantido com firmeza, usando-se um elástico em cada extremidade. Afim de evitar que a aresta das lâminas (que nem sempre são lapidadas) corte o elástico, colocamos sôbre a lâmina, envolvendo todo o sistema, uma cinta de cartolina de cêrca de 1 cm de largura e 7 cm de comprimento. Sôbre a cartolina, enrola-se o elástico. A figura *A* da estampa 31 mostra êsse instrumento simples e útil.

Por transparência podem ser observados todos os movimentos da lagarta, a maneira como ela desintegra e chupa as partículas de cana e como transporta para trás os resíduos ou bagaço. Observamos facilmente a muda, ou ficamos sabendo em que dia a faz, pois a cápsula cefálica é discernivel no meio da serragem. Basta uma observação diária para surpreender todos os principais fatos do desenvolvimento larval.

A troca de alimento precisa ser feita periódicamente, dia sim dia não, ou de 3 em 3 dias. As placas são conservadas em câmara úmida, o que assegura a conservação do alimento.

Temos observado que depois da terceira muda devem ser usadas tábuas mais grossas, afim de proporcionar ambiente mais amplo à lagarta e de dar-lhe maior quantidade de alimento. Exigindo a observação um orifício relativamente pequeno, o volume de alimento é, em consequência, pequeno. Para aumentar êsse volume, de par com o crescer da lagarta, é que aumentamos a espessura da tábua ou superpomos duas ou três tábuas finas.

Ao completar o desenvolvimento larval, (26 dias à temperatura média de 23,6° C.), a lagarta vai para a ranhura, aglutina os resíduos com fios de seda e forma uma cela, entra em prepupa e 2 a 4 dias após, transforma-se em crisálida. Esta pode ser retirada e passada para caixa de Petri, ou ser deixada no próprio ambiente em que se criou a lagarta. Em tal caso convem limpar o orifício, deixando-se nele sòmente a crisálida.

O método acima descrito, que só serve para a observação de detalhes da biologia da *D. saccharalis*, não permite que se obtenha a duração real dos instars larvais, pois a troca periódica de alimento retarda o desenvolvimento.

Para se ter a duração aproximadamente real do desenvolvimento, outro método deve ser seguido. Ao invés da estreita célula, dentro da qual a lagarta é observada por transparência, usamos campânulas de vidro de 30 ou 40 mm de diâmetro por 60 ou 70 mm de altura (as mesmas usadas na criação de Vespas de Uganda) Estampa 31, fig. *B*. As lagartas recem-nascidas são colocadas sôbre um tolete ou segmento de gomo mole, de 20 ou 30 mm de comprimento. A princípio, por serem pequenas, as lagartas consomem pequena quantidade de alimento, fato que permite sejam colocadas 10 em cada tolete. Os segmentos de gomos ou toletes, à medida que recebem as 10 lagartas recem-nascidas, vão sendo alinhadas sôbre uma mesa bem lisa ou sôbre vidro plano; cada um será coberto por uma campânula. A umidade será mantida pela campânula e o CO^2 que se forma consegue escapar por baixo, o que mantem o ambiente adequado ao desenvolvimento do inseto.

Dez ou doze dias depois de postas sôbre os toletes, devem as lagartas ser separadas. Nessa idade já estão no 3.º instar. A quantidade de alimento que durante êsse tempo bastou para 10 lagartas, não chegará, do 3.º ao 4.º instars, para mais de 2 ou 3. Ao mudar o alimento pela primeira vez, temos colocado 2 lagartas em cada tolete, e pela segunda vez, apenas uma lagarta por tolete, pois ela já está quasi no termo de seu desenvolvimento e a observação individual exige essa separação. Atingido o completo desenvolvimento, a lagarta prepara a saída do adulto, que consta de um tunel recurvado, à guisa de opérculo, feito de detritos ligados por fios de seda. O aparecimento dêsse opérculo é o indício seguro de que a lagarta já preparou a câmara pupal e entrou em prepupa. Todo tolete que apresente êsse indício deve ser aberto ao meio, para verificar, todos os dias, quando se dá a transformação. As duas partes do tolete podem, depois de cada observação, ser justapostas e mantidas por um elástico.

Por êste método as anotações são em menor quantidade, pois só nos interessa a duração de cada estádio, não nos preocupando as mudas, os movimentos, etc. Como se depreende, poucas vezes são as lagartas molestadas. A troca de alimento, feita a primeira vez 7 dias após o nascimento, em nada deve alterar a vida da lagarta. A segunda vez, 7 dias depois da primeira, e finalmente a última troca, 6 a 10 dias depois da segunda, também não devem molestar muito a lagarta, pois esta penetra imediatamente no novo tolete.

Os dois métodos se completam: o primeiro dá todos os detalhes do desenvolvimento larval, e o segundo, a duração mais ou menos real dêsse estádio.

A importância do segundo método deve ser aquí realçada, pois êle permite a criação em laboratório de elevado número de lagartas e nele repousa nossa esperança de uma criação em larga escala. Sôbre essas lagartas criadas em laboratório, todas de idade conhecida, tentaremos criar grande número de parasitas de *Diatraea*, única modalidade de combate à broca que se nos afigura viavel para a cultura canavieira em nosso meio.

LABORATORY METHODS FOR OBSERVATION AND REARING OF *DIATRAEA SACCHARALIS* (FABRICIUS, 1794). THE SUGAR CANE BORER

Abstract

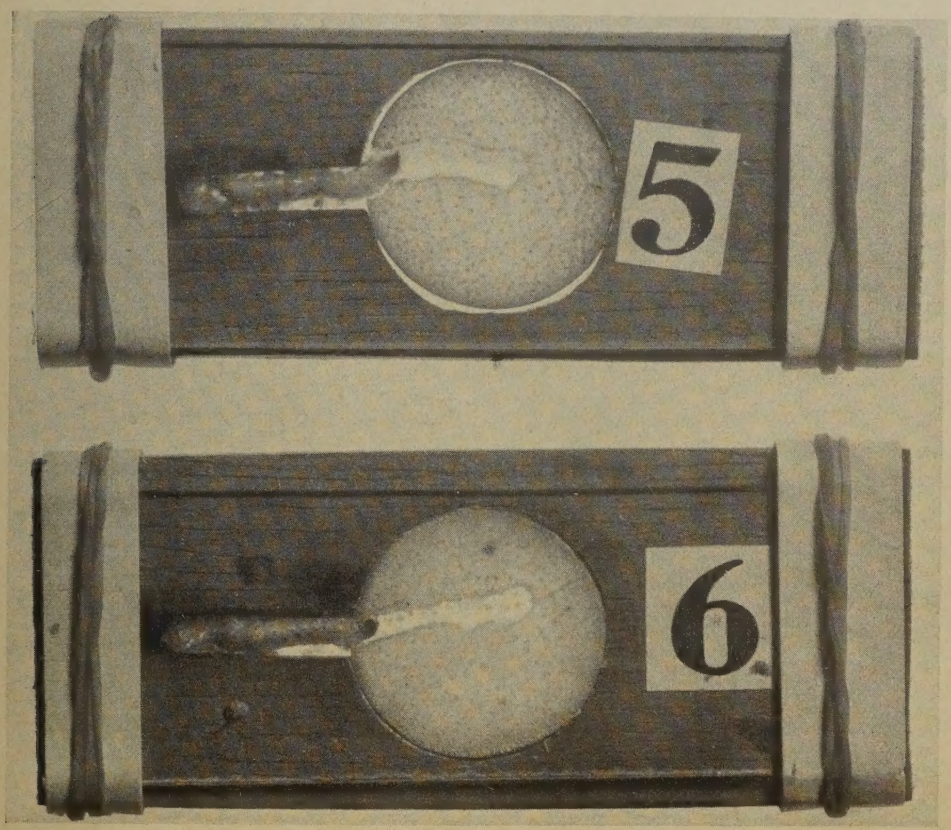
In this paper two new methods for biological and rearing study of sugar cane borer (D. saccharalis) are discussed.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 31

Fig. *A* — Placas para observação do desenvolvimento de lagartas de *Diatraea*.

Fig. *B* — Toletes de cana abrigados por campânulas (Foto B. Mazza).

———o———



A

B

São Paulo
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua 15 de Novembro, 201
1943